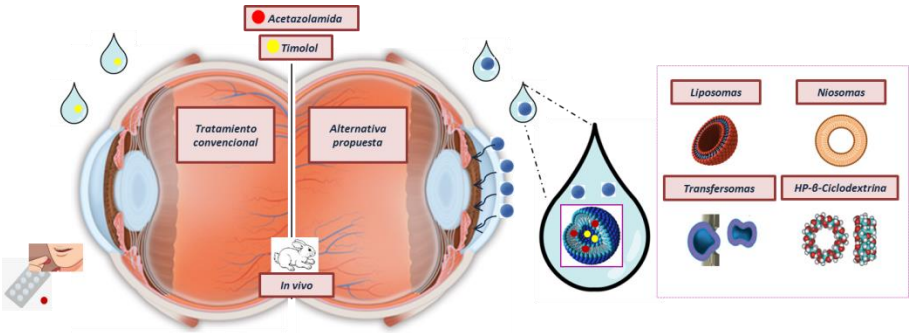
EVALUACIÓN DE NANOSISTEMAS LIPÍDICOS PARA COADMINISTRACIÓN DE MALEATO DE TIMOLOL Y ACETAZOLAMIDA: NUEVA PROPUESTA EN EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA



CARMEN MARTINA ARROYO GARCÍA

Sevilla, 2018

UNIVERSIDAD Ð SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
http://departamento.us.es/tecnofarma/

Memoria presentada por Carmen Martina Arroyo García para optar al Título de Doctora en Farmacia por la Universidad de Sevilla

Fdo.: Carmen Martina Arroyo García

Vº Bº

Los directores del trabajo

Fdo.: Dra. Mª Luisa González Rodríguez
Doctora en Farmacia
Catedrática de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Fdo.: Dra. Mª José Cózar Bernal
Doctora en Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Fdo.: Dr. Antonio M. Rabasco Álvarez
Doctor en Farmacia
Catedrático de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
http://departamento.us.es/tecnofarma/

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Doctora en Farmacia, Catedrática de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, MARÍA JOSÉ CÓZAR BERNAL, Doctora en Farmacia, y ANTONIO MARÍA RABASCO ÁLVAREZ, Doctor en Farmacia, Catedrático de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la memoria de investigación titulada "Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: Nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma", elaborada por la Licenciada en Farmacia Doña **Carmen Martina Arroyo García**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarla.
Para que conste, y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, a dos de mayo de dos mil dieciocho

Fdo.: M.L. González Rodríguez

Fdo.: M.J. Cózar Bernal

Fdo.: A.M. Rabasco Álvarez

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
http://departamento.us.es/tecnofarma/

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRIGUEZ, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la memoria de investigación titulada "Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: Nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma ", realizada por Doña **Carmen Martina Arroyo García**, ha sido dirigida por los doctores María José Cózar Bernal, Antonio María Rabasco Álvarez y la profesora que suscribe, habiéndose realizado en este Departamento, cumpliendo con todas la normas vigentes.

Sevilla, a dos de mayo de 2018

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Fdo.: Dra. María Luisa González Rodríguez

A mi Familia

Agradecimientos

Me gustaría, aunque resulte complicado en unas líneas, expresar la total y absoluta gratitud a todas las personas con las que he compartido momentos en estos años y con las que estaré siempre en deuda.

En primer lugar, quería agradecer a mi grupo de investigación.

Al **Dr. Antonio María Rabasco Álvarez**, por abrirme las puertas de su grupo de investigación, hacerme partícipe de cualquier proyecto o idea de las tantas que emprende o colabora, y transmitirme esas inquietudes constantes de superación; estar bajo su tutela implica un aprendizaje continuo; ha sido muy enriquecedor tanto a nivel científico como personal tener la oportunidad de formar parte de tu equipo. **A la Dra. María Luisa González Rodríguez**, por transmitirme la ilusión por la investigación que desprende en su trabajo diario, por apoyarme en los momentos de flaqueza, por su implicación personal, su constancia, su paciencia meritoria y su total disponibilidad; gracias, aprender a tu lado conlleva entusiasmarse con lo que enseñas. **A la Dra. María José Cózar Bernal,** por sus protocolos a pie de campo al comenzar, su dedicación en la distancia en la última etapa, por mostrarme un ejemplo de perseverancia y motivarme cuando el objetivo perdía sentido, gracias por ser sinónimo de solución para cualquier efecto, por los momentos que has compartido conmigo. No sólo he visto sus facetas de grandes profesionales sino de humanidad y mejores personas.

A mis compañeros del grupo: **Elena, Oliva, Nabila, Ana y Sergio**, por su apoyo y compañía; gracias a vosotros esto ha sido menos largo y más entretenido, soñaremos siempre con las letras “HPLC”, sin él los días hubiesen sido menos emocionantes; y a todos los que han pasado a lo largo de estos años por el laboratorio, en especial a **Lina, Carlitos, Diego, Ana Novak, Attilio, Cayetano, Domingo y Sandra**, todos han participado en este trabajo, gracias, ha sido bonito y divertido compartir esta experiencia con vosotros. Tengo que hacer mención especial a **Elena,** por escuchar mis angustias “técnicas”, el día que empezamos nos planteábamos para qué nos serviría, ahora sabemos que sólo vivirlo ha sido una gran experiencia con la que hemos crecido, me alegro de haberlo compartido contigo, compañera y amiga; y a **Mariló,** por sus correos infinitos con información recopilada de todos los rincones de la US para superar a tiempo los trámites burocráticos, por las tardes rápidas y llamadas infinitas, por el consuelo y las agujetas de risa fusionados, por preocuparte y estar siempre presente.

Al grupo de investigación del Dr. Santiago de Palma, por su colaboración y esfuerzo para que esta tesis llegara a buen fin.

Al grupo de ingenieros de la US del Dr. Pedro González, Dr. Marcos Calle, Dr. Miguel León y Dr. David Canca, por su aportación, esfuerzo e interés mostrado en este proyecto.

Al departamento de Tecnología Farmacéutica de la facultad de Farmacia de la US. Profesores, doctorandos, alumnos y personal administrativo, gracias, por haberme hecho sentir en casa, por el ánimo y cariño que he recibido. En especial, al **Dr. Antonio Ramos Carrillo,** por brindarme siempre su ayuda, por las largas conversaciones siempre pinceladas con algo de historia donde nunca falta el buen humor.

A mis padres, por permitirme vivir esta experiencia, animarme y conseguir que sienta la satisfacción personal que sólo se logra con la constancia y el esfuerzo que con su ejemplo me han inculcado. Espero heredar la actitud y el humor que adoptan ante las dificultades. Sois mis mayores promotores en este proceso, sin vuestro apoyo, estar hoy aquí hubiese sido imposible, gracias por confiar en mí.

A mis hermanos. A Macarena, por su apoyo diario, porque gracias ella llego a tiempo en mis propósitos; por tratar mis sueños como los tuyos propios. **A Venturi**, por recordarme que los deseos con pasión e insistencia se cumplen.

A mis abuelos, por calmar mi impaciencia y hacerme ver desde su experiencia que con esfuerzo y tiempo, todo llega, por sus sabios consejos.

A José Luis, por su paciencia, por compartir sus días conmigo aquí o en la distancia, por estar y animarme ante la incertidumbre, por sobreponerse a los obstáculos que se cruzan en el camino hacia nuestros objetivos y sueños, por creer siempre en mí cuando yo menos creo.

A mis amigos, por entender mis ausencias y hacerme disfrutar en los momentos que el tiempo nos permite. En especial, **a Lupe y Marifé,** por escuchar mis mil y una quejas como si fuese la primera vez que las cuento y adaptar su tiempo al mío. No podía olvidar aquí **a Begoña,** por hacerme entretenidos los días y aguantar mi estrés en la última etapa de esta aventura.

Como consta ya en los libros “En la vida ni se gana ni se pierde, ni se fracasa ni se triunfa, en la vida se aprende, se crece, se descubre; se escribe, borra y reescribe, se hila, deshila y se vuelve a hilar”. Gracias a todos los que habéis incluido y modificado líneas en este capítulo de mi vida.

GRACIAS.

INDICE

Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: Nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma

Carmen Martina Arroyo García

INTRODUCCIÓN

INDICE INTRODUCCIÓN GENERAL

INDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS POR VIA OFTÁLMICA

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA OCULAR

El ojo humano constituye el órgano fundamental del sentido de la vista junto con el cerebro. Como es bien sabido, el globo ocular se encuentra rodeado por tres capas concéntricas, siendo la más externa la capa fibrosa o esclerótica, la intermedia la capa vascular y la más interna la retina. En la capa vascular, también denominada úvea, se distinguen a su vez tres regiones: la coroides, en la porción posterior, y el cuerpo ciliar y el iris en la zona anterior (Goodman, 2003). Además, en la parte anterior y exterior del ojo se encuentra la córnea, tejido ópticamente transparente y avascular que actúa como cubierta protectora del órgano y que permite la entrada de la luz. Junto con el cristalino, centra la imagen en la retina. En la Figura 1 queda plasmada la estructura anatómica ocular.

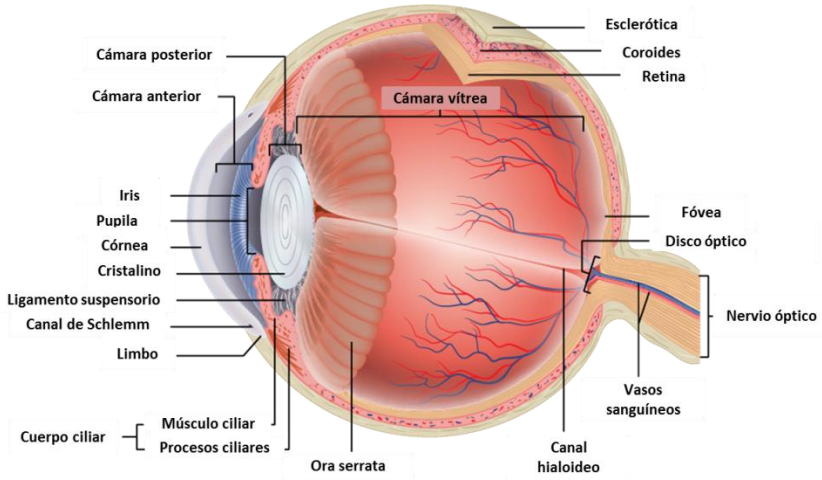


Figura 1. Anatomía ocular (Figura adaptada de http://www.stepwards.com/?page_id=15622).

La córnea está constituida en un 90% por el estroma y éste, a su vez, está formado fundamentalmente por colágeno tipo I. A continuación, la conjuntiva es una membrana que recubre aproximadamente el 80% de la superficie ocular, la cual está constituida por una porción bulbar que cubre la parte anterior del globo, excepto la córnea, y dos porciones palpebrales en las caras posteriores de los párpados superior e inferior.

El iris se identifica por ser la parte coloreada del ojo, que se contrae y se expande para que la pupila deje entrar la cantidad adecuada de luz, la cual es dirigida hacia el cristalino, lente que a su vez enfoca la luz sobre la retina. Por su parte, las fibras nerviosas de la retina llevan la luz y las imágenes al cerebro a través del nervio óptico.

El cuerpo ciliar se ubica entre el iris y la región de la *ora serrata* en la retina, constituido por dos partes bien diferenciadas: *pars plicata* en la parte anterior, y *pars plana* en la posterior, zona donde se encuentra el músculo ciliar, que es el responsable del cambio de forma del cristalino para lograr la correcta acomodación o enfoque.

Detrás de la córnea y delante del iris y el cristalino, se encuentra la cámara anterior. Este espacio, junto a la cámara posterior, se encuentra relleno de un líquido transparente denominado humor acuoso. Éste se produce en la *pars plicata* del cuerpo ciliar mediante la secreción activa de sodio, cloruro y bicarbonato a una velocidad de 2-3 µL por minuto. En la formación de bicarbonato adquiere un papel fundamental la enzima anhidrasa carbónica. El humor acuoso se encuentra circulando de manera continua desde la cámara posterior del ojo a la cámara anterior a través de la pupila y su circulación provee los elementos necesarios para el metabolismo de los tejidos avasculares, como la córnea y el cristalino, elimina restos hemáticos y productos de la inflamación y actúa regulando la presión interna del ojo (12-20 mm Hg). Como se muestra en la Figura 2, este fluido se reabsorbe y drena al sistema venoso por el conducto de Schlemm, situado en la unión entre iris y la córnea (ángulo iridocorneal) a través de la malla trabecular. Una pequeña fracción del líquido se reabsorbe por una vía de drenaje secundaria llamada uveoescleral (Cunha-Vaz, 2004).

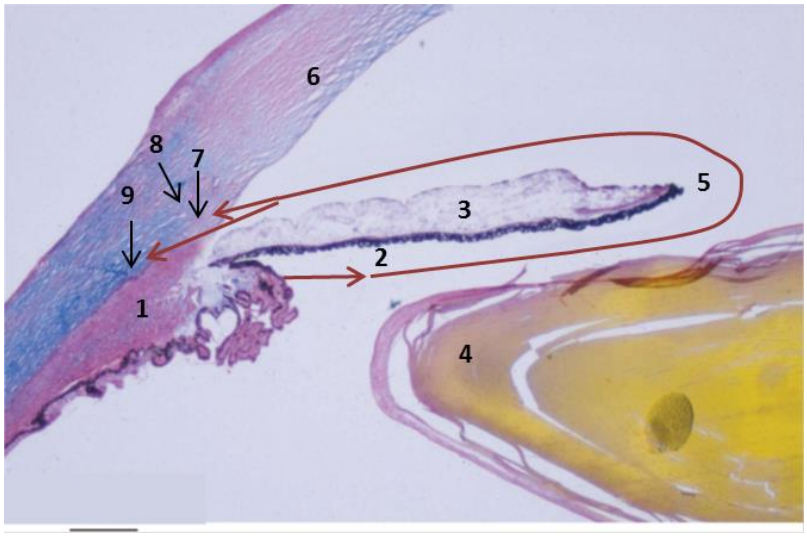


Figura 2. Segmento anterior de un ojo sano con un ángulo abierto de la cámara anterior, con el cuerpo ciliar (1) en la cámara posterior, que es el lugar de producción de humor acuoso, y la hendidura (2) ubicada entre la superficie posterior del iris (3) y la superficie anterior de la lente (4) que funciona como una vía de conexión para el humor acuoso para filtrar (línea roja) desde la cámara posterior a la cámara anterior a través de la pupila (5). El ángulo de la cámara anterior (ángulo iridocorneal) está ubicado entre la córnea (6) y el iris y contiene la malla trabecular (7) y el canal de Schlemm (8). El humor acuoso abandona el ojo a través delamalla trabecular y canal de Schlemm y a través de la vía de salida uveoescleral (9) (Figura adaptada de Jonas et al., 2017).

En la mayoría de las personas, los ángulos de drenaje se encuentran abiertos, si bien en algunos individuos este ángulo puede encontrarse estrechado. Así, el ángulo habitual es de aproximadamente 45 grados, mientras que un ángulo estrecho es de unos 25 grados o menos. Con estas premisas, la presión intraocular (PIO) va a depender de la cantidad de fluido que se encuentre en el interior del mismo, de manera que si el sistema de drenaje del ojo funciona correctamente y la producción de humor acuoso se encuentra en cantidades adecuadas, la fisiología del ojo se mantendrá en perfecto estado. La PIO puede variar a lo largo del día pero, por lo general, se mantiene dentro de un rango que puede regular el propio órgano.

1.2. SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VÍA OFTÁLMICA

Las principales vías de administración en farmacoterapia ocular son la periocular, la intraocular y la tópica. La vía periocular consiste en la inyección

del fármaco en zonas adyacentes a la esclerótica, mientras que la vía intraocular deposita directamente el fármaco en el humor acuoso o en la cavidad vítrea, según sea intracameral o intravítrea, respectivamente.

La vía tópica permite un contacto con la superficie ocular de forma directa. Existen, básicamente, tres tipos de formas farmacéuticas que se administran por esta vía:

- Colirios, definidos como soluciones de principios activos o suspensiones destinados a ser instilados en forma de gotas. Las soluciones se caracterizan por ofrecer un breve tiempo de contacto, por lo que su instilación deberá realizarse repetidamente y a intervalos de tiempo cortos. Con el fin de incrementar la cantidad de preparado remanente en el ojo, tras su administración, los colirios incluyen en su formulación agentes viscosizantes. Además de contener conservantes, pueden incluir antioxidantes y sustancias quelantes.
- Semisólidos, constituidos por bases de absorción (productos grasos) que contienen el principio activo, bien en solución o finamente dispersado en forma de suspensión. Normalmente estos vehículos contienen lanolina y vaselina, motivo por el cual estas pomadas pueden tener un color amarillento. Las preparaciones semisólidas oftálmicas se caracterizan por tener un mayor tiempo de contacto con la superficie aplicada, siendo recomendable su aplicación por la noche ya que dificultan la visión.
- Baños oculares, que son soluciones acuosas destinadas a ser aplicadas en el ojo mediante un dispositivo adecuado y se utilizan generalmente para el lavado ocular.

La administración tópica por esta vía es cómoda, no sólo porque se trata de un método no invasivo, sino porque, además, presenta otras ventajas adicionales como el menor coste, la mayor seguridad y la mejor aceptación por parte de los pacientes debido a su fácil aplicación (Ghate et al., 2008).

La penetración de los fármacos cuando se administran por vía tópica ocular se puede llevar a cabo a través de la córnea (vía transcorneal) o a través de la conjuntiva y esclerótica (vía conjuntival/escleral). Aunque algunas sustancias pueden alcanzar el segmento posterior a través de la vía conjuntival/escleral debido a que es más permeable y menos restrictiva (Urtti, 2006), la mayoría de los fármacos que se administran por vía tópica penetran empleando la vía

transcorneal, a pesar de que ésta última presenta un menor tamaño de los espacios intercelulares y una densidad de poro inferior a la conjuntiva (Hämäläinen et al., 1997).

A pesar de su amplio uso, la vía tópica oftálmica posee ciertas restricciones que son debidas a las propias barreras oculares. Para que un principio activo sea eficaz, debe alcanzar el lugar de acción a una concentración terapéutica adecuada y mantenerse el tiempo óptimo en dicho lugar. Ambos factores (concentración y tiempo) dependerán tanto de la penetración como de la eliminación de dicho fármaco.

Como se aprecia en la Figura 3, la córnea y la conjuntiva actúan como barreras fisiológicas de protección, pero también constituyen el principal obstáculo para la penetración de fármacos.

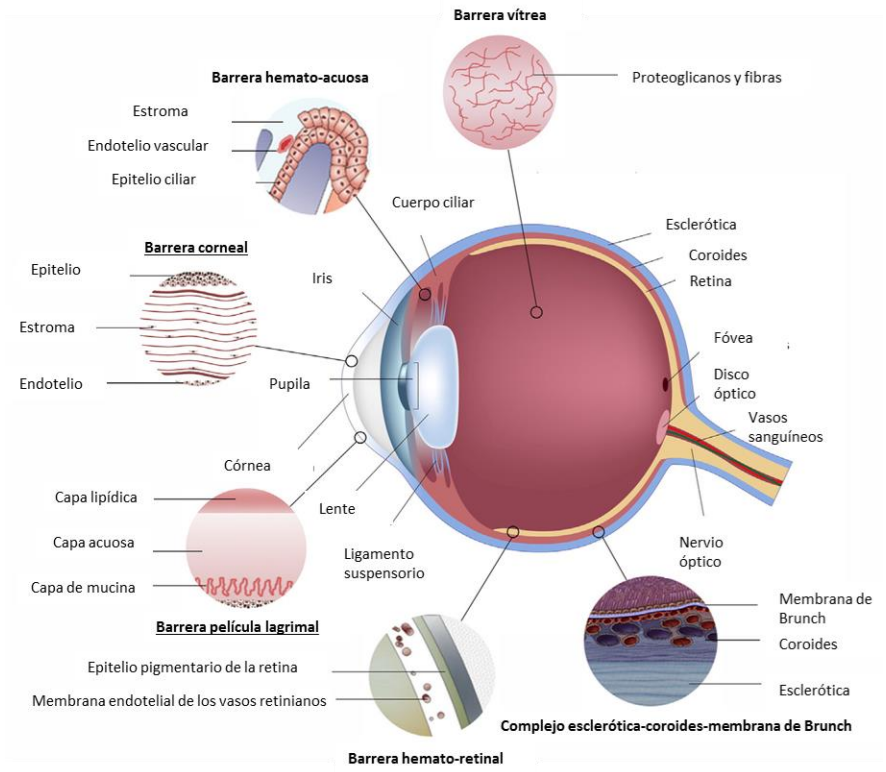


Figura 3. Barreras fisiológicas en la administración de fármacos oculares (Figura adaptada de Huang et al., 2017).

La córnea presenta un espesor de 0,5 mm y posee 5 capas con un diámetro de poro paracelular de 2 nm. Por lo tanto, sólo las moléculas de un peso molecular inferior a 500 Da son capaces de penetrar por la vía paracelular. La

conjuntiva ocupa un área 17 veces mayor, lo que le permitiría una mayor absorción ocular a través de este tejido. Además, el espacio intercelular es más amplio (3-4,9 nm) pudiendo atravesar por ella moléculas de hasta 10 kDa de peso molecular. Sin embargo, la absorción es menor debido a la presencia de capilares sanguíneos conjuntivales que causan pérdidas significativas de los fármacos a la circulación sistémica reduciendo la biodisponibilidad ocular. Por su parte, la esclerótica es más permeable a los solutos que la córnea y la conjuntiva, ya que la difusión transescleral se produce a través de un medio acuoso de proteoglicanos o espacios porosos dentro de la red de colágeno (de 25 a 300 nm) en lugar de una difusión a través de membranas celulares. Sin embargo, el complejo que forma junto a la coroides y la membrana de Brunch plantea una barrera más crítica para la permeación de fármacos por esta vía (Huang et al., 2017).

El entorno intraocular está protegido, además, por la barrera hemato-acuosa, que controla el paso de solutos entre el segmento anterior y posterior, afectando a la administración convencional de gotas oftálmicas por vía tópica y no proporcionando concentraciones eficaces del fármaco en el segmento anterior del ojo. Otras barreras que pueden observarse en la Figura 3, como la barrera vítrea o la barrera hemato-retiniana suponen un impedimento para el tratamiento de patologías oftálmicas pero no afectan a la administración ocular tópica de los fármacos (Huang et al., 2017).

Asimismo, en la anatomía ocular, la película lagrimal precorneal, capa más externa donde se disuelven las moléculas activas instiladas antes de ejercer su acción, constituye otra barrera fisiológica que promueve la eliminación de los fármacos, ya que la actividad metabólica de diferentes enzimas puede conllevar una disminución de la actividad farmacológica. Dicha película está constituida por una capa superficial lipídica en la superficie de contacto aire-lágrima que reduce la velocidad de evaporación de la lágrima, aumenta la tensión superficial y lubrica los párpados. La capa intermedia, que representa casi el total de la película lagrimal, conforma la fase acuosa, la cual suministra el oxígeno atmosférico al epitelio corneal y es la que posee sustancias antibacterianas como lactoferrina y lisozima. Y por último, la capa más interna es la capa de mucina, glucoproteína que convierte una superficie hidrófoba en una superficie hidrófila y permite que el epitelio corneal esté adecuadamente humectado (Mayorga, 2008). Sus parámetros fisicoquímicos y su composición, en condiciones normales, han sido estudiados por diversos autores (Van Haeringen, 1981; Janssen y Van Bijsterveld, 1983), y conocerlos

constituye un factor clave para adecuar las formulaciones. Se conoce que el valor del pH lagrimal basal varía entre 7,3 y 7,6; la osmolalidad lagrimal (aproximadamente 0,9% NaCl) refleja el intercambio de agua y solutos con la córnea y la viscosidad es superior a la del agua. Además, la eliminación rápida de la formulación debido al lagrimeo y el reflejo del parpadeo, hace que el tratamiento de enfermedades oculares como el glaucoma, entre otras, resulte tarea difícil y poco exitosa cuando se aplican formulaciones convencionales.

La mayor parte del principio activo disuelto en la lágrima llega por el mecanismo del parpadeo a las vías de drenaje por el conducto nasolagrimal, pudiendo provocar efectos secundarios sistémicos. La velocidad de drenaje lagrimal está condicionada por factores como el volumen de preparado instilado, la irritación ocular (tamaño de partícula, carga) y el pH y viscosidad de la formulación oftálmica administrada. Se conoce que el volumen de una gota oftálmica en promedio oscila entre 20 y 50 µL, y el volumen lagrimal sin parpadear es de 30 µL reduciéndose a 10 µL durante el parpadeo, lo que supone el 20% del volumen instilado. La velocidad de drenaje es directamente proporcional al volumen instilado (Baeyens et al., 1997), por lo que administraciones superiores a una gota carecen de sentido. En un estudio realizado por Urtti (2006), se comprobó que, en general, sólo el 1-5% del fármaco instilado es capaz de atravesar la barrera corneal. Respecto al pH, el rango tolerado oscila entre 6,6 y 7,8 (Holly et al., 1980), y soluciones con pH inadecuado, al igual que soluciones hipotónicas, producen malestar e irritación ocular. Por otro lado, las soluciones altamente viscosas prolongan el tiempo de permanencia del fármaco en el área precorneal. También hay que considerar que hay una pequeña fracción activa de la cantidad instilada, que sin ejercer efecto terapéutico en las células diana ni drenar por el conducto nasolagrimal, puede penetrar a través de la conjuntiva pasando directamente también a circulación sistémica debido a la vascularización existente en esa zona, provocando efectos secundarios.

Por tanto, la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía tópica ocular en las formas farmacéuticas clásicas (colirios y pomadas oftálmicas), viene condicionada tanto por la naturaleza del principio activo (estructura química, peso molecular, propiedades fisicoquímicas) y de la forma farmacéutica, como por las especiales características anatomofisiológicas del órgano de la vista.

Las gotas oftálmicas convencionales, en monoterapia o en terapia dual, representan casi el 90% de las formulaciones comercializadas actualmente debido a su seguridad, simplicidad y aceptación por parte de los pacientes (Gan et al., 2013; Abdel-Maaboud et al., 2014; Hafez et al., 2014). Sin embargo, se caracterizan por tener baja eficacia ya que, aún con frecuentes aplicaciones, la deficiente biodisponibilidad, consecuencia de todas las vías de pérdida características de este lugar anatómico, tiene como consecuencia que no se consigan niveles terapéuticos suficientemente altos como para poder tratar determinadas enfermedades oculares (Navarro et al., 2008).

Con el fin de superar estos inconvenientes, las tendencias actuales en la terapia oftálmica sugieren el reemplazo de las formas convencionales por nuevos sistemas de administración de fármacos con propiedades biofarmacéuticas mucho mejores y con capacidad para liberar el agente terapéutico de una forma mucho más precisa en el lugar diana en el ojo, prolongando el tiempo de contacto con la superficie ocular, mejorando la biodisponibilidad y disminuyendo la absorción sistémica (Tuomela et al., 2014). En este campo, los sistemas portadores actúan siguiendo dos estrategias principales: a) promover el paso del fármaco a través de la córnea aumentando la permeabilidad corneal; y b) prolongar el tiempo de contacto (Järvinen et al., 1995; Tártara et al., 2012). Para ello, se han desarrollado diferentes estrategias destinadas a la vía tópica ocular tales como geles *in situ* (Morsi et al., 2016), lentes de contacto (Gupta et al., 2012) y sistemas coloidales, que incluyen nanopartículas (Diebold y Calonge, 2010; Sánchez-López et al., 2017), liposomas (Gan et al., 2013; Weng et al., 2017), emulsiones (Gallarate et al., 2013), microemulsiones (Kumar et al., 2014), profármacos y potenciadores de la penetración (Moghimipour et al., 2015; Elnaggar, 2015), entre otros. De ellos, los denominados *nanocarriers*, a base de lípidos, ofrecen numerosas ventajas potenciales como sistemas de administración oftálmica (Gan et al., 2013; Yu et al., 2015), ya que actúan como agentes biónicos de la película lagrimal (poseen propiedades similares). En este sentido, la composición lipídica puede interactuar con la capa lipídica de la película lagrimal, permitiendo a los portadores permanecer en la conjuntiva durante mucho tiempo, donde actúan como depósitos o sistemas reservorio de fármacos. Además, la permanencia ocular de los portadores lipídicos cargados de fármaco puede prolongarse mediante la adhesión de polímeros (Tan et al., 2017). En consecuencia, formulaciones como nanopartículas lipídicas pueden aumentar la permeabilidad corneal;

además, se ha demostrado que liposomas y derivados podrían inhibir la actividad de la glicoproteína P en las células epiteliales, con la apertura de uniones estrechas para mejorar la penetración (Riganti et al., 2011). Entre estos nuevos sistemas, los sistemas coloidales, como los liposomas, han cobrado en la actualidad un enorme interés.

1.3. SISTEMAS VESICULARES: LIPOSOMAS Y DERIVADOS

Los liposomas son vesículas coloidales esféricas microscópicas constituidas por bicapas fosfolipídicas concéntricas que encierran un número igual de compartimentos acuosos, formadas a partir del autoensamblaje de moléculas anfifílicas, tales como fosfolípidos y colesterol. Fueron descubiertos en 1965 por Alex D. Bangham, al estudiar el efecto de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea, observando que éstos, dispersos en agua, formaban espontáneamente vesículas multilaminares (Bangham et al., 1965). En función de su tamaño, número de compartimentos y modo de obtención, los liposomas se clasifican en vesículas multilaminares (MLVs, "*multilamellar vesicles*"); unilaminares pequeñas (SUVs, "*small unilamellar vesicles*"); y unilaminares grandes (LUVs, "*large unilamellar vesicles*") (Tabla 1) (Yokomizo, 1996; Le Bourlais et al., 1998; Samad et al., 2007).

Tipo de liposoma	Tamaño
SUVs	~ 10 nm a 200 nm
LUVs	~200 nm a 1 µm
MLVs	> 0,5 µm

Tabla 1. Clasificación de los liposomas.

Los liposomas pueden elaborarse a partir de una gran variedad de lípidos, siendo los fosfolípidos los principales componentes de la estructura liposomal.

Existen tres tipos fundamentales de fosfolípidos: glicerofosfolípidos, esfingolípidos y glucoesfingolípidos. El fosfolípido más utilizado en la formulación de liposomas es la fosfatidilcolina, debido a su bajo coste de producción, su carga prácticamente neutra y comportamiento químicamente

inerte. Se suele obtener de la lecitina del huevo o la soja. Es una molécula insoluble en agua y su comportamiento está encaminado a minimizar las fuerzas repulsivas entre la fase acuosa y las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (Herrero-Vanrell et al., 2013). Además de este compuesto, en las formulaciones se suelen incorporan cantidades variables de colesterol con la finalidad de aumentar la estabilidad del fármaco en la vesícula y mejorar la eficacia de encapsulación, ya que este esteroide condiciona la permeabilidad y la fluidez de la membrana disminuyendo la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en el interior de las bicapas (Fang et al., 2001). Los fosfolípidos pueden incorporarlo hasta una concentración molar del 50%. Por encima de este valor, los liposomas son metaestables y las vesículas tienden a agregarse y precipitar.

Por regla general, las vesículas lipídicas incluyen diversos agentes para mejorar sus propiedades. Por ejemplo, para obtener vesículas lipídicas cargadas positivamente, se pueden incluir lípidos catiónicos como la estearilamina (EA) o el bromuro de didecildimetilamonio (DDAB) en la bicapa. Por el contrario, para obtener liposomas cargados negativamente, se emplean compuestos aniónicos tales como dicetilfosfato (DP) (Law et al., 2000). La composición de estas vesículas influye en sus características fisicoquímicas de tamaño, carga, termodinámica, laminaridad y elasticidad de la bicapa (Maestrelli et al., 2006; González-Rodríguez et al., 2007; González-Rodríguez y Rabasco, 2011). Estas propiedades fisicoquímicas también son determinantes en el comportamiento de las vesículas y, por lo tanto, en su eficacia como potenciadores de la penetración de fármacos (Elorza et al., 1993; Mainardes et al., 2005; Nii et al., 2005; Hironaka et al., 2009).

Su composición, en la que se encuentra una importante cantidad de lípidos de la membrana celular, su capacidad de encapsular activos de naturaleza muy diversa (hidrófilos en el espacio acuoso e hidrófobos en la bicapa lipídica), su biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, junto a las posibilidades de vectorizar fármacos, los convierten en prometedores transportadores y han favorecido la difusión de su utilización y la continua aparición de nuevas aplicaciones (Sahoo et al., 2008; Akbarzadeh et al., 2013).

En lo que respecta a la vía tópica ocular, el desarrollo de estos sistemas es cada vez más importante en el tratamiento de las patologías oculares, no

sólo para mejorar la eficacia terapéutica sino también para atenuar los efectos adversos sistémicos (Wong et al., 2001). Son muchas las investigaciones que corroboran el éxito de estos sistemas en su uso para administración oftálmica. Su principal fortaleza es que poseen una elevada capacidad para incrementar el tiempo de residencia del fármaco en la superficie ocular mejorando, por lo tanto, la penetración corneal de los mismos, ya que establecen un contacto íntimo con la superficie córneo-conjuntival. Por otra parte, se ha demostrado que la carga superficial del liposoma influye en la penetración a través del epitelio corneal siendo, en la mayoría de los casos, los de carga positiva más adecuados, dada la interacción electrostática entre las cargas positivas de los liposomas y las mucinas cargadas negativamente presentes en la superficie corneal y conjuntival (Rabinovich-Guilatt et al., 2004). Autores como Schaeffer et al. (1982) ya observaron que los liposomas catiónicos de fosfatidilcolina, colesterol y EA en una relación molar 7:2:1 sufren una penetración corneal estadísticamente más alta que los liposomas neutros y aniónicos, mejorando el flujo transcorneal de la penicilina G encapsulada en los liposomas unilaminares positivos hasta 4 veces. Law et al. (1999, 2000) también publicaron estudios con liposomas catiónicos similares en composición, que presentaban mayores concentraciones de aciclovir (ACV) en la córnea que las vesículas aniónicas, debido a su interacción electrostática con la superficie corneal. No obstante, los liposomas aniónicos formulados con DP también drenaron rápidamente en comparación con el ACV libre. Chetoni et al. (2004), compararon una formulación de liposomas de ACV con una pomada actualmente comercializada, observando un aumento de la concentración del fármaco en el humor acuoso de los conejos tras la administración de liposomas en comparación con la pomada, a la misma concentración de ACV.

No obstante, existe una gran controversia respecto a la carga óptima. De este modo, algunos investigadores confirman que los liposomas cargados negativamente también muestran una elevada permeabilidad. Shen et al. (2007) prepararon liposomas de ganciclovir (GCV) con potencial zeta negativo por el método de evaporación en fase reversa. Los liposomas dispersos en una solución de sacarosa mostraron resultados prometedores con una permeabilidad 3.9 veces mayor que la de la solución de GCV.

Una vez administrados en la superficie ocular, los liposomas actúan como un depósito de fármaco permaneciendo en la capa superficial**.** Una vez allí, el fármaco encapsulado en los liposomas puede liberarse bien por difusión

pasiva, o bien por erosión de las vesículas. Mediante difusión pasiva, las moléculas de fármaco tienden a penetrar a través de las capas lipídicas de los liposomas para alcanzar la capa vesicular adyacente, ya sea por mecanismo de difusión o convección. La velocidad de difusión depende del tamaño, la composición de lípidos, y las propiedades del fármaco en sí (Mishra, 2006).

Respecto a otras vías oculares, en la vía intraocular, los liposomas han mostrado una elevada capacidad para proteger y aumentar la vida media de las sustancias activas, evitando las administraciones repetidas hasta alcanzar niveles terapéuticos en el lugar de la acción (Moon et al., 2006). En el caso de la administración intravítrea, existen estudios que ponen de manifiesto su utilidad en la liberación a largo plazo de profármacos lipídicos (Cheng et al., 2000). Nuevas formulaciones de liposomas de flurbiprofeno en hidrogel demostraron ser un método efectivo para conseguir una liberación sostenida y aumentar la biodisponibilidad ocular tras la inyección intravítrea (Pachis et al., 2017).

A pesar de lo expuesto anteriormente, los liposomas convencionales presentan ciertas dificultades para atravesar intactos determinadas capas de la piel o mucosas, y el fármaco queda acumulado en el lugar de aplicación actuando como reservorio (Maestrelli et al., 2006). Actualmente, se han diseñado diferentes tipos de vesículas introduciendo algún componente que modifica sus propiedades, como los niosomas, etosomas y transfersomas, entre otros, los cuales proporcionan beneficios adicionales a los liposomas convencionales con el fin de facilitar el paso de fármacos a través de las mucosas (González-Rodríguez y Rabasco, 2011). Chen et al. (2016) desarrollaron recientemente una preparación mejorada de liposomas, denominados liposomas de segunda generación o transfersomas, concluyendo que éstos constituyen una estrategia prometedora en la vehiculación de fármacos por vía oftálmica, actuando como una plataforma en un sistema de administración de fármacos para mejorar la biodisponibilidad ocular. Autores como Paradkar et al. (2017) desarrollaron niosomas de natamicina formulados en un gel *in situ* capaces de conseguir una liberación prolongada del fármaco durante 24 h en comparación con una formulación comercial, demostrando, por tanto, ser un buen candidato para aumentar el tiempo de residencia precorneal y mejorar la biodisponibilidad ocular ya que se incrementa la permeabilidad corneal, con el fin de reducir la frecuencia de administración del medicamento y los efectos secundarios asociados.

Asimismo, otras técnicas utilizadas con fines a mejorar las formulaciones tópicas, como la incorporación de ciclodextrinas, están dando buenos resultados. Estas se basan en introducir agentes que mejoren la permeación, a la vez que forman complejos de inclusión con el fármaco, aumentando su solubilidad. Rodríguez et al. (2017) han publicado recientemente un estudio en el que investigaron tanto polímeros bioadhesivos (quitosano, ácido hialurónico y alginato) como potenciadores de la permeabilidad, como la hidroxipropil-β-ciclodextrina, analizando la influencia en la permeabilidad del maleato de timolol a través de córneas bovinas *ex vivo*. Los resultados mostraron que sólo los potenciadores de la permeabilidad fueron capaces de aumentar la permeabilidad del fármaco, mientras que los polímeros redujeron significativamente su penetración.

2. GLAUCOMA

2.1. CONCEPTO

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica, progresiva e irreversible, caracterizada por la pérdida progresiva de las células ganglionares de la retina. Como resultado de ello, se produce una disminución en el número de axones derivados de estas células con la consiguiente atrofia del nervio óptico (Yu et al., 2015). Clínicamente, se detecta por la disminución del campo visual y, en ausencia de tratamiento, causa un déficit importante de agudeza visual e incluso ceguera (Goodman, 2003).

El daño secundario del nervio óptico está asociado a un incremento de la PIO. Ya en los años 90, se concluyó en un estudio que el incremento de la PIO es el principal factor de riesgo, tanto para el desarrollo como para la progresión del glaucoma, considerándose patológica cuando el valor es superior a 21 mm Hg. Pero además, existen otros factores de riesgo, aunque poseen menos influencia. Uno de ellos es la herencia familiar: los pacientes con familiares de primer grado afectados tienen un riesgo hasta 8 veces mayor que la población general. La raza negra tiene mayor prevalencia que la blanca y su curso es más severo; según algunos autores, esto podría ser debido a un mayor tamaño de la cabeza del nervio óptico y a una lámina cribosa menos resistente, características fisiológicas de esta raza (Tielsch et al., 1991). Además, el grosor corneal puede ser un factor de riesgo, siendo éste mayor en pacientes con menor espesor de esta membrana (Ortega-Ruiz

et al., 2010). Enfermedades como la diabetes mellitus y el glaucoma podrían tener una relación asociativa positiva puesto que el daño producido en los pequeños vasos sanguíneos de la retina presentes en esta patología desemboca en una retinopatía diabética, aumentando así el riesgo de padecer glaucoma (Becker, 1971; Gerber et al., 2015). Además, existen datos que sugieren que algunos tipos de glaucoma tienen mayor prevalencia en individuos miopes e hipermétropes. Los ojos hipermétropes, al ser más pequeños, suelen tener riesgo de sufrir enfermedades asociadas, como estrechez del ángulo que se establece entre el iris y la córnea, aumentando el riesgo de sufrir esta patología.

Estudios epidemiológicos han demostrado que un control óptimo de la PIO disminuye el riesgo de daño en el nervio óptico y ralentiza la progresión de la enfermedad. Por tanto, la disminución de la PIO se convierte en el factor clave comprobado para prevenir la pérdida de visión causada por el glaucoma (Brechtel-Bindel et al., 2003).

2.2. CLASIFICACIÓN

Existen diversos tipos de glaucoma al igual que distintas formas de manifestación y evolución. Sin embargo, atendiendo a la clasificación principal, según la conformación del ángulo iridocorneal (Figura 3), podemos distinguir entre glaucoma de ángulo abierto y de ángulo cerrado (Pérez-Arellano, 2013). También puede subdividirse la enfermedad en base a su etiología, en función de la presencia o no de alguna patología ocular o sistémica que origine el glaucoma, en cuyo caso se diferencia en glaucoma primario, si esta patología no deriva de una enfermedad preexistente; y en glaucoma secundario, si se origina como consecuencia de otras enfermedades o situaciones que llevan a la obstrucción de los sistemas de drenaje del humor acuoso o a la hipersecreción de dicho humor, con la consecuente elevación de la PIO. Además, según el momento de aparición, se clasifica en glaucoma congénito (pudiendo aparecer los síntomas antes de los 3 años de edad), glaucoma juvenil o infantil y glaucoma del adulto.

2.2.1. Glaucoma de ángulo abierto

El glaucoma crónico de ángulo abierto primario es el tipo más común de glaucoma, con una prevalencia que varía entre el 75 y el 85% (Alfonso et al., 2010; Paczka, 2013). Se debe a la pérdida progresiva de la capacidad de

drenaje del humor acuoso, a pesar de que el ángulo de drenaje esté abierto. Como consecuencia, el fluido acuoso no drena desde el ojo correctamente, aumentando la presión dentro del órgano y dañando el nervio óptico (Porth, 2007). Es asintomático en su inicio y es de gran importancia su tratamiento y diagnóstico precoz para evitar su progresión y que pueda desembocar en una ceguera.

2.2.2. Glaucoma de ángulo cerrado

El glaucoma de ángulo cerrado se caracteriza por el cierre anatómico en su totalidad del ángulo de drenaje, de modo que el fluido acuoso, dentro del ojo, no puede pasar a la malla trabecular, provocando el aumento de la PIO. Esta variante presenta una fisiopatología distinta al glaucoma de ángulo abierto; es menos frecuente y su tratamiento es quirúrgico (Goodman, 2003; Porth, 2007) aunque, en ocasiones, se requiere farmacoterapia. Afecta a ambos ojos, si bien la enfermedad puede progresar de manera diferente en cada uno de ellos. La secreción del humor acuoso es independiente del nivel de PIO, por lo que, en ambos casos, ésta se seguirá produciendo a una velocidad normal indistintamente de que la PIO esté aumentada.

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

El glaucoma constituye la segunda causa principal de ceguera en el mundo. A partir del año 2000, 67 millones de personas padecen glaucoma, de los cuales 6,7 millones de pacientes sufren ceguera bilateral. Esto implica un alto impacto sanitario en la población afligida, asociado a los elevados costes económicos y sociales que ello supone. Muchas personas que padecen glaucoma, sin embargo, no son conscientes de padecerlo, debido a que esta patología es asintomática en sus inicios hasta que se sufre un daño funcional severo que, en muchos casos, se diagnostica tardíamente (Landín et al., 2009). La prevalencia de un tipo u otro de glaucoma varía según la zona geográfica. Así, en los países del mundo occidental, la pérdida de visión derivada del glaucoma de ángulo abierto es más común. En Asia, sin embargo, predomina el glaucoma de ángulo cerrado debido a una predisposición anatómica, ojos cuya cámara anterior es muy estrecha o cuyo globo ocular es pequeño, tendiendo a tener ángulos de drenaje estrechos (Pérez-Díaz, 2009).

2.4. TRATAMIENTO

Aunque el daño del nervio y la pérdida de visión a causa del glaucoma no pueden, generalmente, revertir espontáneamente, esta patología, en general, se puede controlar. Los tratamientos se instauran con el fin de disminuir la PIO y, por lo tanto, previenen o retardan aún más el daño al nervio y la pérdida visual. Los métodos convencionales utilizados en el tratamiento incluyen la farmacoterapia y cirugía láser. El factor común de todos ellos consiste en tratar de disminuir la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar, o bien aumentar el flujo de salida a través de la malla trabecular.

2.4.1. Terapia farmacológica

Las terapias actuales disminuyen la PIO bien reduciendo la formación de humor acuoso, o favoreciendo la salida de líquido a través de la uveoscleral (Aggarwal y Kaur, 2005; He et al., 2013). Una nueva estrategia farmacológica consiste en aumentar el flujo de salida de fluido a través del citoesqueleto de la malla trabecular (Rasmussen y Kaufman, 2014).

Globalmente, el arsenal terapéutico para el tratamiento de esta patología se puede dividir en tres grupos (Hoyng et al., 2000):

I) Fármacos que reducen la producción de humor acuoso:

- *Betabloqueantes*

Los fármacos β-bloqueantes se han convertido en la terapéutica más usada para el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto. Su mecanismo de acción se basa en provocar una disminución de la producción de humor acuoso y un descenso de la PIO. De esta familia se utilizan fármacos vía tópica como timolol (Timoftol®), levobunolol (Betagan®), carteolol (Ocupress®), betaxolol (Betoptic®) y metipranolol (Optipranolol®). Por vía oral se administra propranolol (Sumial®).

- *Inhibidores de la anhidrasa carbónica*

Estos fármacos actúan reduciendo la producción de humor acuoso mediante la inhibición de la anhidrasa carbónica, enzima que como se ha referido anteriormente, adquiere un papel importante en la formación de este líquido. En este grupo se encuentran dorzolamida (Trusopt®) y brinzolamida

(Azopt®), de administración por vía oftálmica en colirios. Por vía oral, se administran acetazolamida (Edemox®) y diclofenamida (Glaumid®).

II) Fármacos que favorecen el drenaje del humor acuoso

- *Análogos de las prostaglandinas*

Su estructura química es similar a la de las prostaglandinas endógenas. Actúan aumentando el drenaje de fluido desde el ojo a través del sistema uveoescleral. Pueden modificar ligeramente el color del iris, así como espesar y oscurecer las pestañas. También son más propensas a causar enrojecimiento de los ojos, pudiendo, en algunos pacientes, provocar inflamación. Este grupo incluye fármacos como latanoprost (Xalatan®), travoprost (Travatan®), bimatoprost (Lumigan®) y trafluprost (Taflotan®), todos ellos de administración oftálmica en colirios.

- *Agentes parasimpaticomiméticos*

También denominados mióticos, estos fármacos actúan aumentando la difusión del humor acuoso vía trabecular, ya que la contracción del músculo ciliar y del esfínter del iris modifican la abertura de la conformación de la malla trabecular, facilitando el flujo a través del canal de Schlemm. Compuestos pertenecientes a este grupo son pilocarpina (Salagen®) y demecario (Humorsol®). Actualmente, pilocarpina es el único que se utiliza en el tratamiento del glaucoma, ya que el resto requiere ser administrado tres o cuatro veces al día, con los efectos secundarios a nivel oftálmico asociados a esta administración repetida.

- *Agonistas adrenérgicos*

Estos fármacos actúan de forma no selectiva, como adrenalina, en los receptores alfa y beta, aumentando el drenaje del humor acuoso. El más representativo del grupo es brimonidina (Alphagan®). Sin embargo, hay al menos un 12% de riesgo de reacciones locales significativas, sobre todo de tipo alérgico. Otros miembros de esta clase de fármacos incluyen epinefrina, dipivefrina (Propine®) y apraclonidina (Lopidine®).

III) Fármacos que reducen el volumen del humor vítreo

- *Agentes osmóticos*

Constituyen un tipo adicional de fármacos utilizados para tratar las formas repentinas o agudas de glaucoma, donde la PIO sigue siendo muy elevada a pesar de la aplicación de otros tratamientos. Actúan elevando la

concentración de los fluidos extravasculares generando una variación osmótica entre el plasma y el humor vítreo.

2.4.2. Cirugía de glaucoma o láser

Existen en la actualidad distintas formas de terapias con láser para el tratamiento del glaucoma. El tipo de cirugía láser dependerá de la forma de glaucoma y de su gravedad (Egbert et al., 2001; Melamed et al., 2003; Kadasi et al., 2016). Los tratamientos frecuentes son la trabeculoplastia con láser de argón (TLA), trabeculoplastia selectiva con láser (TSL), iridotomía periférica con láser (IPL) y ciclofotocoagulación con láser.

La farmacoterapia empleada para esta patología ha presentado una gran evolución en los últimos años. Los estudios que se están desarrollando en este campo se basan en la mejora del comportamiento de moléculas activas preexistentes y en la investigación de nuevos principios activos. En los fármacos comercializados con buenos perfiles de eficacia se busca obtener una mejor tolerancia local, utilizando conservantes menos tóxicos, una mayor biodisponibilidad o una disminución de los efectos secundarios sistémicos. Asimismo, el desarrollo de nuevas combinaciones fijas de fármacos comercializados podría facilitar su administración y el cumplimiento terapéutico. Respecto a esta última vertiente de investigación, algunos antiglaucomatosos en estudio son análogos de prostaglandinas, antagonistas del calcio, antagonistas de la endotelina, agonistas/antagonistas de los receptores de renina-angiotensina, inhibidores de la rho-kinasa y antagonistas de los receptores de los esteroides (Muñoz-Negrete et al., 2009; Weinreb et al., 2014).

3. TIMOLOL

3.1. ANTECEDENTES

Timolol fue descubierto por científicos de Frost-Merck en 1971. Es un betabloqueante que se sigue utilizando en el tratamiento del glaucoma a lo largo ya de más de tres décadas (Brooks y Gillies, 1992). La eficacia de esta molécula activa ha sido ampliamente comparada con la de otros principios activos, ofreciendo ésta mejores perspectivas ya que produce menos efectos adversos que otros fármacos de su mismo grupo; por ejemplo, la ausencia de efecto sobre el tamaño pupilar o la acomodación, respecto a la miosis

producida por los agentes colinérgicos. Esto ha contribuido a mantener su uso durante años. Se ha demostrado en pacientes con glaucoma e hipertensión ocular que aproximadamente el 70% responden al tratamiento con timolol (Neufeld et al., 1983; Camras et al., 2003).

En 1978, se desarrolló el primer medicamento tópico con este betabloqueante para el tratamiento del glaucoma, Timoptic®, como maleato de timolol (TM). En 1993, la primera formulación de liberación prolongada de TM tópico llegó al mercado, Timoptic-XE® (TM oftálmico en solución formadora de gel). En algunos estudios se ha mostrado una menor exposición sistémica al timolol tras la administración de una dosis diaria de Timoptic-XE 0,5% frente al tratamiento de dos veces al día con solución oftálmica de TM 0,5% (Shedden et al., 2001).

En la actualidad, son numerosos los autores que presentan datos prometedores para la liberación sostenida de este fármaco incluyendo en la formulación potenciadores de la permeación (Wei et al., 2006; Moosa et al., 2014) que permitirían el uso de esta molécula tan eficaz e irreemplazable durante décadas a una dosis inferior evitando así los efectos adversos no deseados. Investigaciones recientes han revelado que liposomas de TM recubiertos con quitosano mostraron un perfil de liberación prolongada del fármaco, con un aumento de la permeación ocular, del tiempo de residencia precorneal y de su biodisponibilidad (Tan et al., 2017). Además, otros autores como Yu et al. (2015) han obtenido interesantes resultados que indican que los geles de formación *in situ* conteniendo liposomas que incorporan TM tienen una capacidad potencial para la administración oftálmica, reduciendo la PIO y prolongando el tiempo efectivo ($P \leq 0,05$) en comparación con las soluciones oftálmicas.

3.2. ESTRUCTURA QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS

Según la IUPAC, su nombre químico es (S)-1-(terc-butilamino) -3-[(4-morfolino-1, 2, 5-tiadiazol-3-il) oxi]-2-propanol maleato (1:1) (sal). TM posee un átomo de carbono asimétrico en su estructura y se dispone como el levo-isómero (Figura 4). Su peso molecular es 432,50 g/mol y su fórmula molecular $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$.

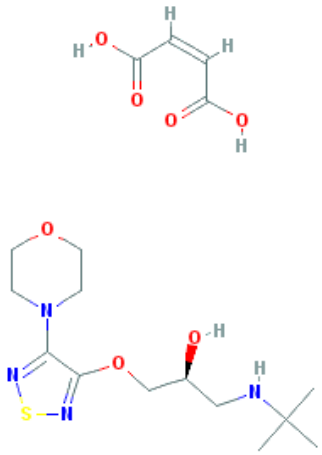


Figura 4. Estructura química de TM.

Respecto a las propiedades fisicoquímicas y moleculares, TM es soluble en agua (2,74 mg/mL) y en etanol al 96%, presentando un pKa de 9,21 (Natu et al., 2011). Presenta valores de rotación óptica y punto de fusión de -4,2° y 201,5–202,5 °C, respectivamente. Su longitud de onda de máxima absorción en UV es 294 nm.

Generalmente, la biodisponibilidad ocular del fármaco es inferior al 10% debido a la escasa permeación y elevada eliminación de los fármacos administrados por esta vía. De hecho, algunos investigadores han confirmado mediante estudios experimentales que aproximadamente cuatro quintas partes del timolol 0,5% p/v administrado en gotas oftálmicas fue absorbido desde el ojo hacia la circulación sistémica (Korte et al., 2002). Otros estudios han confirmado que los transportadores celulares no juegan un papel importante en la penetración ocular de timolol, por lo que las investigaciones deben centrarse en aumentar este parámetro incluyendo o modificando los componentes de la formulación (Sakanaka et al., 2006). Tras la absorción, el fármaco se distribuye y se metaboliza antes de ser eliminado del organismo, siendo el volumen de distribución de 1,3-1,7 L/Kg. Según estudios de Volotinen et al. (2011), el metabolismo de timolol es principalmente hepático (80%) a través del citocromo P450 CYP2D6, siendo éste y sus metabolitos excretados fundamentalmente en la orina (Edeki et al., 1995; Attar et al., 2005; Nieminen et al., 2005a). Atraviesa la barrera

placentaria y se excreta por la leche materna. La semivida de eliminación oscila entre 2 y 5 horas y en lo referente a toxicidad, su LD50 es de 1190 mg/kg (oral en ratones), valores inalcanzables a través de una administración oftálmica. Los síntomas de sobredosis incluyen somnolencia, vértigo y cefaleas.

3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo exacto por el cual ejerce su acción de disminuir la PIO no está totalmente establecido (Jung et al., 2013). Sin embargo, parece ser que bloquea la producción de humor acuoso por los procesos ciliares mediante la reducción del flujo sanguíneo y la síntesis de AMPc (Neufeld, 1979). El inicio de la acción aparece a los 30 minutos aproximadamente.

3.4. FORMAS FARMACÉUTICAS PARA ADMINISTRACIÓN OCULAR

TM para administración tópica ocular está disponible en colirio en concentraciones de 0,25 y 0,50% p/v, siendo la dosis recomendada para adultos (incluidos pacientes de edad avanzada) de una gota en el ojo afectado, una vez al día. No se ha establecido la seguridad y la eficacia en niños y adolescentes.

3.5. REACCIONES ADVERSAS

Este fármaco presenta una buena tolerancia para la mayoría de los pacientes, siendo las reacciones adversas locales más importantes la irritación y el ojo seco. Sin embargo, aunque algunos pacientes que han sido tratados durante períodos prolongados no presentan efectos adversos graves, como consecuencia de la absorción sistémica del, aproximadamente, 80% de la cantidad instilada, otros manifiestan efectos secundarios como bradicardia, hipotensión y síncope y efectos cardiovasculares de los fármacos adrenérgicos β-antagonistas (Shell, 1982; Zimmerman et al., 1983; Nelson et al., 1986; Korte et al., 2002). Las reacciones pulmonares como broncoespasmo y aumento de la tos también tienen relación directa con el antagonismo de los receptores β2. Autores como Nieminen et al. (2005b) han demostrado niveles plasmáticos de timolol correlacionados con efectos secundarios cardiovasculares adversos tras la administración oftálmica de formas farmacéuticas convencionales de timolol. Además, otros estudios muestran la existencia de un porcentaje significativo de bloqueos

auriculoventriculares provocados por colirios betabloqueantes (Rubín et al., 1999).

4. ACETAZOLAMIDA

4.1. ANTECEDENTES

En 1954, la Compañía American Cyanamid presentó este poderoso inhibidor de la anhidrasa carbónica, acetazolamida (ACZ), como el primer diurético oral. Becker (1954) demostró que este fármaco era capaz de reducir la PIO tras encontrarse la enzima por primera vez presente en la parte anterior del ojo de conejo y posteriormente confirmarse su presencia en los procesos ciliares (Wistrand, 1951; Lütjen-Drecoll et al., 1983). Otras investigaciones también demostraron la eficacia del fármaco en pacientes con glaucoma tras su administración oral (Gloster y Perkins, 1955) siendo avaladas en estudios sucesivos (Joyce et al., 1989). Sin embargo, estos avances venían acompañados de efectos adversos que intentaron ser abolidos mediante el desarrollo de una formulación tópica de ACZ. Muchos autores siguieron esta dirección con resultados notables, pero las formulaciones tópicas no tuvieron éxito inicialmente debido a la baja biodisponibilidad de esta molécula, que puede ser en gran medida atribuida a un bajo coeficiente de permeabilidad y una escasa solubilidad bifásica (acuosa y oleosa) (Duffel et al., 1986). Aunque algunos investigadores siguieron insistiendo con formulaciones liposomales de ACZ, ya que mostraban una reducción sostenida de la PIO en conejos, minimizando los efectos secundarios encontrados en la administración oral (El-Gazayerly et al., 1997), durante aproximadamente dos décadas, esta línea de investigación fue abandonada ante la imposibilidad de desarrollar una formulación tópica eficaz.

Con los años, ha aumentado el interés por la administración tópica de esta molécula, teniendo como factor limitante su penetración inadecuada. Las alternativas investigadas para aumentar la penetración y efectividad han sido amplias: modificaciones estructurales del fármaco, empleo de altas concentraciones, dosis múltiples, vehículo en gel, sales solubles en agua y el uso de soluciones acuosas que contienen ciclodextrinas o en forma liposomal, entre otras (Kaur et al., 2000). En los últimos años, autores como Tártara et al. (2012) han mostrado con estudios *in vivo* que la incorporación de ACZ en coageles al 0,4% provoca un mayor efecto hipotensor en

comparación con la formulación comercial Azopt® (brinzolamida 1%), debido principalmente al efecto prolongado de la primera. Otros autores han demostrado que la inclusión de ACZ en niosomas fue muy efectiva prolongando la disminución de la PIO (Guinedi et al., 2005).

4.2. ESTRUCTURA QUÍMICA Y FARMACOCINÉTICA

Según la IUPAC, su nombre químico es N-(5-aminosulfonil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida y su fórmula molecular $C_4H_6N_4O_3S_2$. Esta molécula presenta un peso molecular de 222,237 g/mol. En la Figura 5 se presenta su estructura química.

Figura 5. Estructura química de la ACZ.

Respecto a los datos físico-químicos, esta molécula es muy poco soluble en agua (0,98 mg/mL) y poco soluble en etanol al 96% (Natu et al., 2011). Se disuelve en disoluciones diluidas de hidróxidos alcalinos y presenta un valor de punto de fusión de 258-259 °C. Su longitud de onda de máxima absorbancia es 265 nm.

ACZ presenta una buena absorción en el tracto gastrointestinal, apareciendo la concentración plasmática a las 2-4 horas tras su administración oral. Los niveles plasmáticos efectivos se mantienen durante 4-6 horas, y son paralelos al efecto hipotensor. No sufre procesos de biotransformación, excretándose inalterada por la orina. Aparece en la leche materna.

4.3. MECANISMO DE ACCIÓN

ACZ es usada oralmente para el tratamiento del glaucoma actuando como inhibidor de la anhidrasa carbónica. En el ojo, esta enzima se encuentra en la membrana de las células ciliares que separan el humor acuoso de la sangre y cataliza reversiblemente la reacción de agua y dióxido de carbono para formar ácido carbónico (HCO_3^-). El ión HCO_3^- se vierte al humor con el

consiguiente paso de agua, provocando un aumento de la PIO sobre el iris y el nervio óptico (Kaur et al., 2002).

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_{3-}$$

4.4. FORMAS FARMACÉUTICAS

ACZ se utiliza por vía oral y está disponible en comprimidos, aunque pueden elaborarse formulaciones magistrales en forma de suspensión (García-López et al., 2017). Las dosis empleadas en el tratamiento del glaucoma oscilan entre 250 mg a 1 g de ACZ en 24 horas, usualmente divididas en dosis de 250 mg. Se ha demostrado que dosis superiores a 1 g no mejoran la respuesta terapéutica.

4.5. REACCIONES ADVERSAS

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica orales, como ACZ, son muy eficaces en la reducción de la PIO, pero sus frecuentes efectos secundarios como fatiga, anorexia, depresión, parestesias, alteraciones electrolíticas en plasma, litiasis renal o discrasias sanguíneas limitan su empleo. Para obtener la reducción deseada en la PIO, se requieren grandes dosis orales de ACZ, y esto suele conducir a efectos secundarios sistémicos, siendo los más comunes la diuresis y la acidosis metabólica (Kaur et al., 2000). Autores como Joyce et al. (1989) publicaron estudios de pacientes con la sintomatología característica de los efectos adversos propios de este principio activo tras su administración oral tanto en comprimidos tradicionales como de liberación retardada.

La presente Tesis Doctoral se divide en tres capítulos en los que se recogen tres de las cinco publicaciones derivadas de los resultados obtenidos. En el **Capítulo I** se llevó a cabo el desarrollo de una formulación para administración oftálmica a partir de liposomas que incorporaban TM utilizando diferentes herramientas para su optimización, y posteriormente, se analizó su eficacia mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. En el **Capítulo II** se desarrolló, mediante la aplicación del concepto de la Calidad por Diseño una formulación de liposomas que incorporaba un segundo fármaco, ACZ, para aprovechar el efecto sinérgico de la co-administración oftálmica. Previamente, se desarrolló y validó un método analítico para la determinación simultánea de ambos fármacos. Por último, en el **Capítulo III**, se incluyó en la formulación un derivado de ciclodextrinas para solventar los problemas de solubilidad de la ACZ, y se formularon otro tipo de vesículas con agentes tensioactivos no iónicos. Ambas formulaciones se probaron en estudios *in vitro* e *in vivo*. La Figura 6 recoge un esquema de las formulaciones desarrolladas para administración oftámica a lo largo de la tesis.

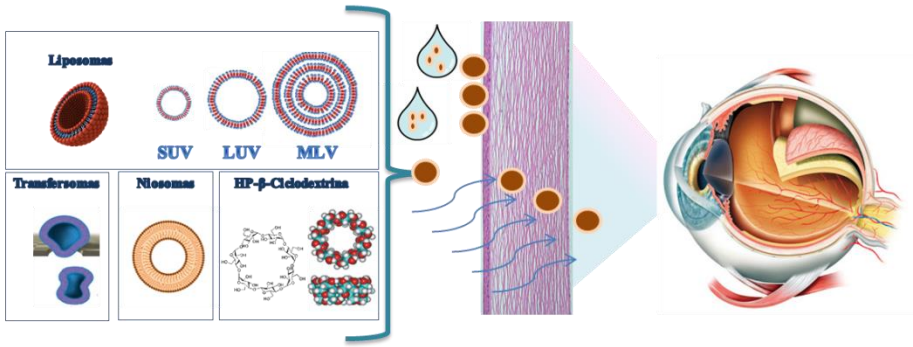


Figura 6. Administración oftálmica de fármacos mediante el diseño y desarrollo de sistemas vesiculares.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Maaboud IM, Abdel-Wadooda HM, Mousab HS. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: a novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. Talanta. 2014;130:495-505.

Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. Int J Pharm. 2005;290(1):155-159.

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Nejati-Koshki K. Liposomes: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters. 2013;8(1):102.

Alfonso LRD, Rodríguez BNS, Curbelo MJ, Serrano YS, Armengol ARM. Caracterización epidemiológica del glaucoma primario de ángulo abierto. Medisur. 2010;8(5):348-352.

Attar M, Shen J, Ling KHJ, Tang-Liu D. Ophthalmic drug delivery considerations at the cellular level: drug-metabolising enzymes and transporters. Expert Opin Drug Deliv.2005;2(5):891-908.

Baeyens V, Gurny R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. Pharm Acta Helv. 1997;72(4):191-202.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol. 1965;13(1):238-252.

Becker B. Diabetes mellitus and primary open-angle glaucoma: the XXVII Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol. 1971;71(1):1-16.

Brechtel-Bindel M, González-Urquidí O, Marco Marco A, Torres A, Aguilar-Montes G, Bustos-Zepeda M, Dávila JG. Glaucoma primario de ángulo abierto. Rev Hosp Dr. Gea González. 2003;4(3):61-68.

Brooks AM, Gillies WE. Ocular β-blockers in glaucoma management. Drugs & Aging. 1992;2(3):208-221.

Camras CB, Hedman K. US Latanoprost Study Group. Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma. J Glaucoma. 2003;12(6):466-469.

Cheng L, Hostetler KY, Chaidhawangul S, Gardner MF, Beadle JR, Keefe KS, Freeman WR. Intravitreal toxicology and duration of efficacy of a novel antiviral lipid prodrug of ganciclovir in liposome formulation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(6):1523-1532.

Chen H, Pan H, Li P, Wang H, Wang X, Pan W, Yuan Y. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. Colloids Surf B Biointerface. 2016;143:455-462.

Chetoni P, Burgalassi S, Monti D, Mariotti S, Saettone MF. Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits. J Ocul Pharmacol Ther. 2004;20(2):169-177.

Cunha-Vaz JG. The blood–retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. Exp Eye Res. 2004;78(3):715-721.

Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. Prog Retin Eye Res. 2010;29(6):596-609.

Duffel MW, Ing IS, Segarra TM, Dixson JA, Barfknecht CF, Schoenwald RD. N-Substituted sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with topical effects on intraocular pressure. J Med Chem. 1986;29(8):1488-1494.

Edeki TI, He H, Wood AJ. Pharmacogenetic explanation for excessive β-blockade following timolol eye drops: potential for oral-ophthalmic drug interaction. JAMA. 1995;274(20):1611-1613.

Egbert PR, Fiadoyor S, Budenz DL, Dadzie P, Byrd S. Diode laser transscleral cyclophotocoagulation as a primary surgical treatment for primary open-angle glaucoma. Arch Ophthalmol. 2001;119(3):345-350.

El-Gazayerly ON, Hikal AH. Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as an ocular delivery system. Int J Pharm. 1997;158(2):121-127.

Elnaggar YS. Multifaceted applications of bile salts in pharmacy: an emphasis on nanomedicine. Int J Nanomed. 2015;10:3955-3971.

Elorza B, Elorza MA, Sainz MC, Chantres JR. Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. J Microencapsulation. 1993;10(2):237-248.

Fang JY, Hong CT, Chiu WT, Wang YY. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. Int J Pharm. 2001;219(1):61-72.

Gallarate M, Chirio D, Bussano R, Peira E, Battaglia L, Baratta F, Trotta M. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. Int J Pharm. 2013;440(2):126-134.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov Today. 2013;18(5/6):290-297.

García-López I, Fuentes-Ríos JE, Manrique-Rodríguez S, Fernández-Llamazares CM. Off-label and unlicensed drug use: results from a pilot study

in a paediatric intensive care unit. Anales de Pediatría (English Edition). 2017;86(1):28-36.

Gerber AL, Harris A, Siesky B, Lee E, Schaab TJ, Huck A, Amireskandari A. Vascular dysfunction in diabetes and glaucoma: a complex relationship reviewed. J Glaucoma. 2015;24(6):474-479.

Ghate D, Edelhauser HF. Barriers to glaucoma drug delivery. J Glaucoma. 2008;17(2):147-156.

Gloster J, Perkins ES. Effect of a carbonic anhydrase inhibitor (Diamox) on intra-ocular pressure of rabbits and cats. Br J Ophthalmol. 1955;39(11):647-658.

González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-Rodríguez PL, Rabasco AM. Application of statistical design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. Int J Pharm. 2007;337(1):336-345.

González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. Expert Opin Drug Deliv. 2011;8(7):857-871.

Goodman A. Ed. Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª edición. Vol I. México: McGraw-Hill Interamericana. 2003:223-276.

Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. Int J Pharm. 2005;306(1):71-82.

Gupta H, Aqil M. Contact lenses in ocular therapeutics. Drug Discov Today. 2012;17(9):522-527.

Hafez HM, Elshanawane AA, Abdelaziz LM, Mohram MS. Development and validation of HPLC method for simultaneous estimation of brimonidine tartrate and timolol maleate in bulk and pharmaceutical dosage form. J Appl Pharm. 2014;6(4):398-407.

Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38(3):627-634.

He W, Guo X, Feng M, Mao N. In vitro and in vivo studies on ocular vitamin A palmitate cationic liposomal in situ gels. Int J Pharm. 2013;458(2):305-314.

Herrero-Vanrell R, de la Torre MV, Andrés-Guerrero V, Barbosa-Alfaro D, Molina-Martínez IT, Bravo-Osuna I. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview. J Drug Deliv Sci Technol. 2013;23(2):75-102.

Hironaka K, Inokuchi Y, Tozuka Y, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. J Control Release. 2009;136(3):247-253.

Holly FJ. Artificial tear formulations. Int Ophthalmol Clin. 1980;20(3):171-184.

Hoyng PF, Van Beek LM. Pharmacological therapy for glaucoma. Drugs. 2000;59(3):411-434.

http://www.stepwards.com/?page_id=15622. Octubre, 2017.

Huang D, Chen YS, Rupenthal ID. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. Adv. Drug Deliv. Rev. 2017, http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.008.

Janssen PT, Van Bijsterveld OP. Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24(5):623-630.

Joyce PW, Mills KB, Richardson T, Mawer GE. Equivalence of conventional and sustained release oral dosage formulations of acetazolamide in primary open angle glaucoma. Br J Clin Pharmacol. 1989;27(5):597-606.

Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. Lancet. 2017; 390: 2083,93; http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1.

Jung JH, Abou-Jaoude M, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. J Control Release. 2013;165(1):82-89.

Kadasi LM, Wagdi SAFA, Miller KV. Selective laser trabeculoplasty as primary treatment for open-angle glaucoma. RI Med J. 2016;99(6):22-5.

Kaur IP, Singh M, Kanwar M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. Int J Pharm. 2000;199(2):119-127.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. Int J Pharm. 2002;248(1):1-14.

Korte JM, Kaila T, Saari KM. Systemic bioavailability and cardiopulmonary effects of 0,5% timolol eye drops. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2002;240(6):430-435.

Kumar R, Sinha VR. Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery. Colloids Surf B Biointerface. 2014;117:82-88.

Landín M, López GR, Rodríguez DJ. Comportamiento clínico epidemiológico del glaucoma neovascular en un servicio de glaucoma. Archivo Médico Camagüey. 2009;13(3).

Law SL. Properties of acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Int J Pharm. 1999;161(2):253-259.

Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: corneal penetration and absorption. J Control Rel. 2000;63(1-2):135-140.

Le Bourlais C, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverge R. Ophthalmic drug delivery systems—recent advances. Prog Retin Eye Res. 1998;17(1):33-58.

Lütjen-Drecoll E, Lönnerholm G, Eichhorn M. Carbonic anhydrase distribution in the human and monkey eye by light and electron microscopy. Arch Clin Exp Ophthalmo. 1983;220(6):285-291.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int J Pharm. 2006;312(1):53-60.

Mainardes RM, Urban MC, Cinto PO, Khalil NM, Chaud MV, Evangelista RC, Daflon Gremiao MP. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. Curr Drug Targets. 2005;6(3):363-371.

Mayorga MT. Película lagrimal: estructura y funciones. Ciencia & Tecnología para la Salud Visual y Ocular. 2008;11:121-131.

Melamed S, Simon GJB, Levkovitch-Verbin H. Selective laser trabeculoplasty as primary treatment for open-angle glaucoma: a prospective, nonrandomized pilot study. Arch Ophthalmol. 2003;121(7):957-960.

Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent application of liposomes mediated transcutaneus immunization against Hepatitis B. Vaccine. 2006;24(22):4847-4855.

Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-enhancing effects of bile salts. Molecules. 2015;20(8):14451-14473.

Monti D, Chetoni P, Burgalassi S, Najarro M, Saettone MF. Increased corneal hydration induced by potential ocular penetration enhancers: assessment by differential scanning calorimetry (DSC) and by desiccation. Int J Pharm. 2002;232(1-2);139-147.

Moon JW, Song YK, Jee JP, Kim CK, Choung HK, Hwang JM. Effect of subconjunctivally injected, liposome-bound, low-molecular-weight heparin on the absorption rate of subconjunctival hemorrhage in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47(9):3968-3974.

Moosa RM, Choonara YE, du Toit LC, Tomar LK, Tyagi C, Kumar P, Pillay V. In vivo evaluation and in-depth pharmaceutical characterization of a rapidly

dissolving solid ocular matrix for the topical delivery of timolol maleate in the rabbit eye model. Int J Pharm. 2014;466(1):296-306.

Morsi N, Ghorab D, Refai H, Teba H. Ketoroloactromethamine loaded nanodispersion incorporated into thermosensitive in situ gel for prolonged ocular delivery. Int J Pharm. 2016;506(1):57-67.

Muñoz-Negrete FJ, Pérez-López M, Won KH, Rebolleda G. New developments in glaucoma medical treatment. Arch Soc Esp Oftalmol. 2009;84(10):491-500.

Natu MV, de Sousa HC, Gil MH. Electrospun drug-eluting fibers for biomedical applications. In Active implants and scaffolds for tissue regeneration. 2011 (pp. 57-85). Springer Berlin Heidelberg.

Navarro G, Cabral P, Malanga A, Savio E. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2008;37(2):212-223.

Nelson WL, Fraunfelder FT, Sills JM, Arrowsmith JB, Kuritsky JN. Adverse respiratory and cardiovascular events attributed to timolol ophthalmic solution, 1978–1985. Am J Ophthalmol. 1986;102(5):606-611.

Neufeld AH. Experimental studies on the mechanism of action of timolol. Surv Ophthalmol. 1979;23(6):363-370.

Neufeld AH, Bartels SP, Liu JH. Laboratory and clinical studies on the mechanism of action of timolol. Surv Ophthalmol. 1983;28:286-290.

Nieminen T, Uusitalo H, Mäenpää J, Turjanmaa V, Rane A, Lundgren S, Ropo A, Rontu R, Lehtimäki T, Kähönen M. Polymorphisms of genes CYP2D6, ADRB1 and GNAS1 in pharmacokinetics and systemic effects of ophthalmic timolol. Eur J Clin Pharmacol. 2005a;61:811-819.

Nieminen T, Uusitalo H, Turjanmaa V, Bjärnhall G, Hedenström H, Mäenpää J, Ropo A, Heikkilä P, Kähönen M. Association between low plasma levels of ophthalmic timolol and haemodynamics in glaucoma patients. Eur J Clin Pharmacol. 2005b;61:369-374.

Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. Int J Pharm. 2005;298(1):198-205.

Ortega-Ruiz B, Armengol-Oramas Y, Guerra-Fernández A, Herrera-Hernández N. Importancia del espesor corneal central en pacientes sospechosos de glaucoma, hipertensos oculares y normales. Rev Med Electron. 2010;32(1):25-31.

Pachis K, Blazaki S, Tzatzarakis M, Klepetsanis P, Naoumidi E, Tsilimbaris M, Antimisiaris SG. Sustained release of intravitreal flurbiprofen from a novel

drug-in-liposome-in-hydrogel formulation. Eur J Pharm Sci. 2017;109:324-333.

Paradkar MU, Parmar M. Formulation development and evaluation of Natamycin niosomal in-situ gel for ophthalmic drug delivery. Drug Deliv Sci Technol. 2017;39:113-122.

Paczka Zapata J. Epidemiología del glaucoma en América Latina. Rev Sal Ocul Comunit. 2013;5(13):77-78.

Pérez-Arellano JL. Sisinio de Castro. Manual de patología general. Elsevier Health Sciences. 2013

Pérez-Díaz L. Glaucoma: principal problema de salud en los miembros de la Asociación Nacional del Ciego en Santiago de Cuba. MEDISAN. 2009;13(2):2.

Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C. Cationic vectors in ocular drug delivery. J Drug Target. 2004;12(9-10):623-633.

Rasmussen CA, Kaufman PL. Exciting directions in glaucoma. Can J Ophthalmol. 2014;49(6):534-543.

Riganti C, Voena C, Kopecka J, Corsetto PA, Montorfano G, Enrico E, Bosia A. Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells. Mol Pharm. 2011;8(3):683-700.

Rodríguez I, Vázquez JA, Pastrana L, Khutoryanskiy VV. Enhancement and inhibition effects on the corneal permeability of timolol maleate: polymers, cyclodextrins and chelating agents. Int J Pharm. 2017;529(1-2)168-177.

Rubín LJ, Hevía NS, Veganzones BA, Barriales AV. Atrioventricular block secondary to topical ophthalmic beta blockers. Rev Esp Cardiol. 1999;52(7):532.

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug discovery today. 2008;13(3):144-151.

Sakanaka K, Kawazu K, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M, Nakamura T, Sasaki H. Transport of timolol and tilisolol in rabbit corneal epithelium. Biol Pharm Bull. 2006;29(10):2143-2147.

Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. Current drug delivery. 2007;4(4):297-305.

Sánchez-López E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, García ML. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye–Part II-Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm. 2017;110:58-69.

Schaeffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1982;22(2):220-227.

Shedden AH, Laurence J, Barrish A, Olah TV. Plasma timolol concentrations of timolol maleate: timolol gel-forming solution (TIMOPTIC-XE®) once daily versus timolol maleate ophthalmic solution twice daily. Doc Ophthalmol. 2001;103(1):73-79.

Shell JW. Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs. Surv Ophthalmol. 1982;26(4):207-218.

Shen Y, Tu J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. AAPS J. 2007;9(3):371-377.

Tan G, Yu S, Pan H, Li J, Liu D, Yuan K, Pan W. Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: a more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. Int J Biol Macromolec. 2017;94:355-363.

Tártara LI, Quinteros DA, Saino V, Allemandi DA, Palma SD. Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. J Ocul Pharmacol Ther. 2012;28(2):102-109.

Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma: the Baltimore Eye Survey. JAMA. 1991;266(3):369-374.

Tuomela A, Liu P, Puranen J, Rönkkö S, Laaksonen T, Kalesnykas G, Oksala O, Ilkka J, Laru J, Järvinen K, Hirvonen J, Peltonen L. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated intraocular pressure in vivo. Int J Pharm. 2014;467(1):34-41.

Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(11):1131-1135.

Van Haeringen NJ. Clinical biochemistry of tears. Surv Ophthalmol. 1981;26(2):84-96.

Volotinen M, Hakkola J, Pelkonen O, Vapaatalo H, Mäenpää J. Metabolism of ophthalmic timolol: new aspects of an old drug. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011;108(5):297-303.

Wei G, Ding PT, Zheng JM, Lu WY. Pharmacokinetics of timolol in aqueous humor sampled by microdialysis after topical administration of thermosetting gels. Biomed Chrom. 2006;20(1):67-71.

Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. Jama 2014;311(18):1901-1911.

Weng Y, Liu J, Jin S, Guo W, Liang X, Hu Z. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. Acta Pharm Sin B. 2017;7(3):281-291.

Wong CG, Rich KA, Liaw LHL, Hsu HT, Berns MW. Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit. Curr Eye Res. 2001;22(2):140-147.

Wistrand PJ. Carbonic anhydrase in the anterior uvea of the rabbit. Acta Physiol. 1951;24(2-3):144-148.

Yokomizo Y. Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro; an analysis of the molecular mechanism, using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. J Control Release. 1996;42:249-262.

Yu S, Wang QM, Wang X, Liu D, Zhang W, Ye T, Pan W. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for opthalmic delivery of timolol maleate. Int J Pharm. 2015;480(1):128-136.

Zimmerman TJ, Baumann JD, Hetherington J. Side effects of timolol. Surv Ophthalmol. 1983;28:243-249.

CAPÍTULO I

"Desarrollo de una formulación de maleato de timolol en liposomas convencionales y deformables"

ÍNDICE CAPÍTULO I

INDICE DE FIGURAS CAPÍTULO I

INDICE DE TABLAS CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TRANSFERSOMAS

En la última década, los transfersomas se han convertido en una herramienta versátil para mejorar la estabilidad de las vesículas lipídicas. Comparándose potencialmente con los liposomas, se han utilizado para encapsular una amplia gama de fármacos con el fin de aumentar su biodisponibilidad (Elsayed et al., 2007; Sahoo et al., 2008; Gan et al., 2013; Hao et al., 2014). Se trata de vesículas lipídicas que pueden deformarse y atravesar una membrana biológica sin ser destruidas (Romero y Morilla, 2013; Ascenso et al., 2015) y así, junto a una adecuada eficacia de encapsulación, pueden acceder a estructuras más internas y liberar el fármaco dentro, para alcanzar concentraciones terapéuticas adecuadas (Touitou et al., 2000; Ghodeswar y Rai, 2010). Estas vesículas elásticas pasan a través de estructuras estrechas bajo la influencia de un gradiente de actividad de agua, basado en el modelo teórico descrito por algunos autores como Cevc (1995). Según Cevc, la mejora en la liberación del fármaco a partir de liposomas deformables se debe a la fuerza impulsora proporcionada por el gradiente osmótico generado entre las capas externa e interna de la membrana. Por lo tanto, pueden atravesar intactas espontáneamente la membrana bajo la influencia del gradiente de hidratación, como han demostrado posteriormente otros autores en estudios *in vivo* por vía transdérmica (Schatzlein et al., 1998).

En cuanto a su composición, además de los fosfolípidos y colesterol propios de la estructura de un liposoma convencional, se incluyen los denominados “activadores del borde” en el interior de la matriz fosfolipídica. Son tensioactivos biocompatibles capaces de ofrecer un elevado radio de curvatura, responsables de la desestabilización de la bicapa lipídica, que provocan un aumento de su fluidez y elasticidad, permitiendo una mejora en el transporte de la molécula encapsulada a través de la membrana (El Zaafarany et al., 2010; Di Marzio et al., 2012). En este grupo de compuestos cabe destacar el desoxicolato sódico (Deo-Na) o el Tween® 20 (Tw20). Como es de suponer, en base a la naturaleza química de estas moléculas, la concentración que le confiere a la vesícula la capacidad de ultradeformabilidad es crucial, ya que a bajas concentraciones aporta flexibilidad a las membranas vesiculares mientras que una concentración alta causa la destrucción de las mismas. Por tanto, la flexibilidad de la membrana

de los transfersomas se consigue mediante la mezcla de estos componentes de superficie correctamente seleccionados y en las proporciones adecuadas.

Respecto a la vía ocular, estas características hacen que las formulaciones presenten una ventaja fundamental respecto a los liposomas, y más aún respecto a las formas convencionales como los colirios, en términos de penetración en la córnea y efectos terapéuticos (Paolino et al., 2005; Elsayed et al., 2006). La principal diferencia entre los transfersomas y las vesículas lipídicas convencionales radica en la elevada adaptabilidad dependiente del estrés de las vesículas flexibles, la cual les permiten deformarse y pasar entre las células que componen las membranas biológicas, como la córnea. Así, las vesículas que poseen una mayor deformabilidad de su membrana podrían penetrar la membrana lipídica a través de las vías o poros hidrófilos entre las células sin perder su integridad vesicular. En cambio, los liposomas con bicapas menos flexibles se fracturarían durante el transporte a través del poro. La flexibilidad reduce al mínimo el riesgo de ruptura de la vesícula en la córnea y les permite seguir el gradiente de agua natural a través de la membrana (Rajan, 2011). Para la vía oftálmica, Shen y Tu (2007) propusieron que los liposomas elásticos pueden penetrar en la estructura corneal de un modo similar a como lo hacen a través del estrato córneo. Al ser los transfersomas más elásticos que los liposomas tradicionales se utilizan, por lo tanto, como un nuevo sistema de transporte efectivo para la administración oftálmica.

Estructuralmente poseen propiedades casi metastables, que permiten a la membrana ultraflexible de la vesícula adquirir una alta deformabilidad, reduciéndose a menos de una décima parte su propio diámetro cuando pasan a través de los poros de la membrana administrándose en condiciones no oclusivas (Gupta et al., 2012). La mezcla combinada de lípidos apropiados con agentes activadores de borde confiere a los transfersomas la capacidad de penetrar a través de poros que son de un tamaño inferior a su propio diámetro. Además, se espera que los diámetros finales de los transfersomas se mantengan incluso después de que las vesículas pasen por estos poros pequeños, en ausencia de fragmentación (Lei et al., 2013).

Los transfersomas mantienen las propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad de sus precursores. Poseen una eficacia de incorporación de moléculas de aproximadamente el 90% en el caso de fármacos lipófilos. Este tipo de vesículas protegen al fármaco encapsulado de la degradación

metabólica y funcionan como un depósito, ya que liberan su contenido lentamente y de forma gradual (Prajapati et al., 2011). La elevada tolerabilidad y eficacia de estos sistemas vesiculares abre un gran potencial en la terapéutica farmacológica. Al igual que ocurre con otros sistemas de administración de fármacos, se espera que la tecnología de estos nanotransportadores pueda evolucionar aún más hacia la mejora de aspectos como la ultradeformabilidad, su administración en otros dispositivos, como parches y hacia el diseño de formulaciones adicionales especiales (Prajapati et al., 2011). También este tipo de vesículas puede constituir una alternativa en las nuevas terapias locales y sistémicas con agentes que no pueden penetrar a través de las membranas eficientemente, por sí solos, por difusión pasiva. Estas vesículas modificadas han sido ampliamente estudiadas vía percutánea, mientras que para la administración oftálmica el número de estudios publicados es más limitado (Maestrelli et al., 2010; Cevc, 2012; Song et al., 2012; Mahmood et al., 2014). En la Tabla 1 se recogen algunos de los trabajos publicados en los últimos años en esta línea de investigación con resultados prometedores.

Fármaco	Resultados	Autores
Melatonina	Liposomas elásticos de melatonina presentaron buenos perfiles de permeación *ex vivo* en piel de cadáver humano, revelando una disminución del tiempo de retraso de la penetración de melatonina, eliminando de este modo las limitaciones de lenta permeación y escasa permeabilidad de la piel asociada con el fármaco.	Dubey et al. (2006)
Aciclovir (ACV)	Liposomas elásticos catiónicos para la administración tópica de ACV presentaron una mayor penetración *ex vivo* en la piel de oído de cerdo, siendo más alta la concentración del fármaco cuando se administraba en liposomas deformables que en liposomas convencionales.	Peira et al. (2007)
Naringenina	Los resultados mostraron que, al usar liposomas elásticos como soporte, las cantidades de deposición de naringenina en la piel aumentaron significativamente aproximadamente 7,3~11,8 veces y 1,2~1,9 veces respectivamente, cuando se compararon con la solución acuosa saturada y los grupos tratados con la solución del fármaco en Tween® 80.	Tsai et al. (2015)
Terconazol (TC)	Los resultados revelaron que la formulación óptima de liposomas ultradeformables de TC exhibía un flujo superior *ex vivo* a través de la córnea del conejo cuando se comparó con los liposomas convencionales, niosomas y suspensión del fármaco.	Abdelbary et al. (2016)
Flurbiprofeno (FB)	Liposomas deformables cargados con FB recubiertos con quitosano al 0,1% mostraron un coeficiente de permeabilidad 4,59 veces mayor que el de la solución de FB.	Chen et al. (2016)
Baicalina (BA)	Resultados *in vivo* en epidermis humana mostraron una actividad antiinflamatoria significativa de liposomas deformables cargados con BA, ya que fueron capaces de reducir el daño cutáneo inducido por la aplicación de este éster de forbol, incluso en comparación con dexametasona.	Mir-Palomo et al. (2016)
Anfotericina B (ANFB)	La acumulación total de ANFB en piel humana durante 1 h de aplicación no oclusiva fue 40 veces mayor cuando se aplicó desde liposomas ultradeformables que desde liposomas convencionales, proporcionando una importante penetración de este fármaco hacia las capas epiteliales profundas.	Pérez et al. (2016)
Citarabina (CT) como fármaco modelo	Los resultados de la administración de liposomas deformables con un fármaco modelo para administración tópica en tratamientos quimioterapéuticos revelaron una mejora del flujo transdérmico, tiempo de retardo disminuido y ausencia de irritación en la piel de los nanoliposomas deformables de CT en comparación con liposomas convencionales y una solución de este fármaco, concluyendo que la vía transdérmica para los fármacos quimioterápicos podría ser una alternativa óptima para proporcionar un nivel sostenido de fármaco.	Raj et al. (2016)
Papaína (PP)	La administración tópica de liposomas elásticos de PP en la cicatriz hipertrófica en piel de oído de conejo mostró mayores cantidades acumulativas y flujos que la solución de papaína.	Chen et al. (2017)
Psoraleno (PS) y resveratrol (RT)	PS y RT encapsulados en liposomas ultradeformables presentan un prometedor potencial terapéutico para el tratamiento de vitíligo en comparación con el control.	Doppalapudi et al. (2017)
Metotrexato (MTX)	La cantidad acumulada de MTX permeado durante 24 h en un estudio *in vivo* en ratas a partir liposomas ultradeformables vehiculizados en gel fue 1,5 y 2,15 veces superior a la de liposomas convencionales dispersos en gel y la solución de MTX en gel, respectivamente.	Zeb et al. (2017)

Tabla 1. Aplicación de liposomas deformables administrados por vía tópica.

Se han publicado diversos métodos para analizar la deformabilidad o elasticidad de los liposomas deformables, como la resonancia de spin de electrones (Gillet et al., 2009), microscopía electrónica o ultrasonidos (Cevc, 2012). Sin embargo, el método más explorado es la extrusión forzada de una dispersión lipídica de liposomas a través de uno o más filtros nanoporosos (Figura 1). En estas formulaciones, la presión mínima requerida para los lípidos con una baja tensión de lisis de la bicapa es relativamente baja. Esta estrategia ha sido utilizada por numerosos autores (Lei et al., 2013; Liu et al., 2013; Carrer et al., 2014). Una ligera modificación de esta fórmula aplica la medición del volumen de paso a través del filtro usando una jeringa, pudiéndose calcular el porcentaje del volumen extruido como [(volumen después de la extrusión) / (volumen inicial)]·100 (Oh et al., 2011).

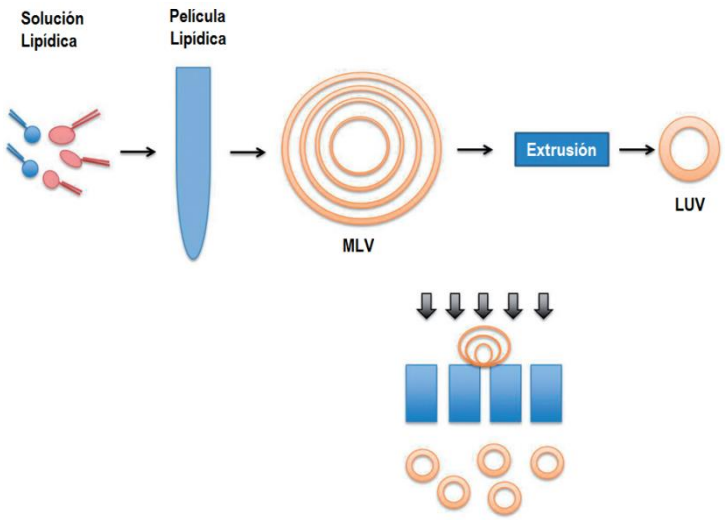


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de extrusión. Las formulaciones de LUV se generaron después de extruir muestras de MLV.

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dentro del ámbito de la Tecnología Farmacéutica, los estudios de preformulación, caracterización y evaluación se distinguen por presentar un elevado y variado número de posibles factores que pueden influir en el desarrollo y optimización de las distintas formas farmacéuticas.

Mediante diversas aproximaciones, es posible acercarse a la consecución de los objetivos fijados, esto es, generar una formulación óptima en relación a determinados parámetros establecidos y/o conocer cómo dichos parámetros afectan a la formulación. Debido a que el procedimiento clásico de "ensayo-error", caracterizado por la necesidad de efectuar un elevado número de experimentos, se centra de forma exclusiva en el estudio de los efectos introducidos en los sistemas únicamente por los factores principales, no resulta posible conocer si la formulación óptima se ha alcanzado realmente (Wu y Wu, 2000) ni permite conocer la influencia de las interacciones producidas entre los distintos parámetros. Así, el acercamiento clásico a la planificación de experimentos requiere mucho tiempo y esfuerzo y, en aquellos casos en los que puedan aparecer interacciones entre los distintos elementos que conforman el estudio, resulta, en la práctica, un modelo poco factible.

El principal problema que se presenta a la hora de iniciar el diseño de experimentos reside en decidir qué conjunto de pruebas pondrán de manifiesto de forma más clara y con menor esfuerzo los diversos aspectos de interés del problema. Por esta razón, cada vez es más frecuente acudir a técnicas estadísticas que detecten y evalúen los factores más relevantes implicados en el proceso, aportando la mayor información posible con el mínimo número de experimentos. El camino más eficaz para optimizar el fin buscado y reducir el tiempo en el proceso de obtención de resultados, se basa en el diseño experimental (Sánchez-Lafuente et al., 2000).

Se puede definir diseño experimental o diseño factorial de experimentos como la estrategia para proyectar, seleccionar o establecer el menor número de experimentos, de tal manera que la información requerida se obtenga del modo más eficaz y preciso posible, llevando a cabo eficazmente la experimentación necesaria (Lewis y cols., 1999). El diseño experimental está considerado como una de las técnicas más útiles para hallar aquellos parámetros óptimos con los que llevar a cabo procesos en los que se encuentren involucrados múltiples factores o variables, haciendo posible, además, evaluar la influencia relativa de cada uno de ellos en los resultados experimentales de forma individual. El diseño experimental es una estrategia que implica la utilización de elementos matemáticos y estadísticos con objeto de obtener la máxima información a través de los datos experimentales y encontrar las condiciones óptimas para la ejecución de un determinado proceso experimental.

Por otro lado, dado que esta herramienta estadística permite definir la influencia de cada factor en las respuestas consideradas, es posible cuantificar y predecir los efectos de cambios potenciales en las formulaciones o en las distintas variables de los procesos (Furlanetto et al., 2000; Gotti et al., 2000).

A continuación, se definen los conceptos más habituales que intervienen en el planteamiento de este tipo de diseños experimentales:

- Respuesta: es el nombre genérico que se asigna a la característica estudiada. Se clasifican los estudios en uni-respuesta o multi-respuesta en función de que se analicen una o varias respuestas utilizando los mismos experimentos.
- Factores: se designa de esta forma a las variables que se considera pueden afectar a la respuesta y que, por tanto, se hallan incluidas en el plan de experimentación.
- Niveles: son los valores que toma un factor o una variable en un determinado experimento.

1.2.1. Diseños factoriales con variables a dos niveles

Los diseños factoriales completos permiten experimentar en todas las combinaciones de variables y niveles. Por ello, utilizados secuencialmente, hacen posible acercarse al nivel óptimo de cada factor y estimar las interacciones que pudieran ocurrir entre ellos. Asimismo, proporcionan estimaciones de los efectos de las variables con una varianza reducida, y resultan relativamente sencillos de construir y analizar. En estos diseños completos, el número de experimentos que es preciso realizar queda determinado al fijar el número de variables con las que se llevará a cabo dicho experimento (Sánchez-Lafuente et al., 2001).

La notación utilizada para referirnos a los diseños factoriales es una potencia de n, del tipo n^k. La n significa que cada factor tomará n niveles, y k es el número total de factores que intervendrán en la experimentación. El resultado de elevar n^k proporciona el número de experimentos que deberán realizarse.

La amplia difusión de los diseños 2^k se fundamenta en tres motivos (Barrentine, 1999):

a) Proporcionan una excelente relación entre el esfuerzo experimental y la información obtenida.

b) Resultan relativamente sencillos de construir, analizar e interpretar.

c) Son fáciles de combinar entre sí para obtener diseños más complejos.

Sin embargo, el principal inconveniente de los diseños completos reside en la necesidad de efectuar un gran número de experimentos, que crece de forma exponencial con el número de factores, como se desprende de la notación 2^k utilizada. Así, en el caso de considerar siete factores, un diseño factorial completo exigiría la realización de 2^7, es decir, 128 experimentos, siendo tal volumen de experimentación, en la mayoría de los casos, inviable.

Esta limitación puede soslayarse mediante dos procedimientos: 1) la utilización de dos niveles para cada variable, o 2) el desarrollo de diseños factoriales fraccionados, con distinto grado de saturación. Los diseños utilizados más frecuentemente son los diseños factoriales a dos niveles (Barrentine, 1999; Gløgård et al., 2002), es decir, diseños del tipo 2^k. En este caso, los valores correspondientes a los dos niveles se codifican asignando al nivel bajo el valor -1 (o simplemente -), y al nivel alto +1 (o simplemente +). Si el factor es cualitativo, se asigna arbitrariamente el valor -1 a un nivel y +1 al otro. Hay que considerar, a título de ejemplo, que a partir de un diseño 2^7, se pueden estimar 128 efectos que se distribuirían de la forma indicada en la Tabla 2.

Número de efectos	**Descripción del efecto**
1	Media
7	Efectos principales
21	Interacciones de 2 factores
35	Interacciones de 3 factores
35	Interacciones de 4 factores
21	Interacciones de 5 factores
7	Interacciones de 6 factores
1	Interacciones de 7 factores

Tabla 2. Distribución de los efectos en un diseño factorial completo 2^7.

En la práctica, resulta extremadamente raro que aparezcan interacciones de tres o más factores que resulten ser significativas (Abdel-All et al., 2003). En otras palabras, podría decirse que, de forma general, se obtienen explicaciones suficientemente buenas del comportamiento de los sistemas bajo estudio considerando sólo los efectos principales y las interacciones de 2 factores. Es posible, por tanto, renunciar a parte de la información que proporciona un diseño 2^7 completo, lo que permite a su vez prescindir de la realización de algunos experimentos. Para realizar el estudio de los efectos de interés es, por tanto, suficiente, realizar una parte (fracción) del diseño completo. Estos diseños reciben el nombre de "diseños factoriales fraccionales" o "diseños fraccionales".

Los diseños fraccionales utilizan la notación 2^{k-p}, donde 2 sigue siendo el número de niveles, k el número de factores con los que se experimentará, y la letra p indica el grado de fraccionamiento. De esta forma, el resultado de elevar 2 a k-p indica el número de experimentos que van a realizarse.

A diferencia de los diseños factoriales completos, donde se estiman por separado los efectos principales y sus interacciones, en los diseños fraccionados, un único valor corresponde a la suma de varios efectos, afirmándose entonces que los efectos están confundidos. Estos términos confundidos pueden ser interacciones de tres o cuatro factores que, generalmente, no tienen importancia y son despreciables. Pero también puede darse el caso que se confunda un efecto principal con la interacción de otros dos factores, con lo que se perdería información útil del sistema. El compromiso está en la reducción del número de experimentos que comporta un diseño factorial fraccionado a costa de la precisión disminuida en la estimación de un efecto.

El nivel de confusiones que presenta un diseño se denomina resolución. Así, en un diseño de resolución IV, habrá confusión entre interacciones de dos factores entre sí (por ejemplo, AxB y CxD) o entre un efecto principal y una interacción entre tres parámetros (por ejemplo A y BxCxD). Para una resolución III, existe confusión entre un factor principal y la interacción de otros dos factores (A y BxC), etc… La resolución suele indicarse en la notación del diseño con números romanos, por ejemplo, 2^{4-1}_{IV}, o 2^{5-2}_{III}.

Existe, asimismo, otra justificación para la realización de diseños factoriales fraccionados, y ésta se encuentra en el hecho de que en la significación de los efectos se cumple, en general, el principio de Pareto, o de la escasez de

efectos significativos. Cuando se estudia un elevado número de factores, sobre todo en las fases iniciales de una experimentación, suele cumplirse que unos pocos factores son los responsables de la mayor parte de las variaciones en la respuesta, siendo en estos factores en los que hay que centrar la atención. Los factores restantes producen cambios de menor cuantía en la respuesta, muchas veces indistinguibles del ruido experimental. Cuando esto ocurre, los diseños fraccionales permiten estudiar de manera completa los efectos de las variables activas.

En el diseño de experimentos, el método de Taguchi constituye una poderosa herramienta que permite predecir y prevenir problemas de calidad desde las etapas tempranas del desarrollo y diseño de un producto o proceso (Wu y Wu, 2000). El método de Taguchi se encuentra englobado en el ámbito de lo que se ha designado como "ingeniería de calidad" (Taguchi, 1991). La utilización de esta tecnología permite diseñar y obtener sistemas robustos, es decir, sistemas menos vulnerables ante determinados factores de ruido no controlados y que pueden ser la causa de un aumento en la variabilidad de la respuesta (Wu y Wu, 2000).

El desarrollo de un experimento mediante la metodología de Taguchi se utiliza para seleccionar la mejor combinación de niveles de los factores de control con objeto de optimizar la "robustez" de la función estudiada del producto con respecto a los factores de ruido (Taguchi, 1987). Un factor de control es aquel que puede seleccionarse y fijarse a un cierto nivel después del diseño de parámetros (Stone y Veevers, 1994). Por el contrario, un factor de ruido es el que no puede ser controlado debido a las razones prácticas, económicas o de cualquier otro tipo (Taguchi, 1991).

1.3. OPTIMIZACIÓN

La preparación de sistemas de administración de fármacos en formulaciones nanoparticulares implica el manejo y la optimización de un gran número de factores. Como se ha comentado anteriormente, a medida que aumenta el número de factores, estos tipos de métodos se vuelven altamente ineficientes. En este sentido, las metodologías de diseño experimental, como el diseño factorial fraccionado, entre otras, se han utilizado ampliamente para reducir el número de ensayos experimentales y el tiempo necesario, mientras que se obtiene información relevante comprobada estadísticamente (González-Rodríguez et al., 2012; Singh et al., 2012). Sin

embargo, estos métodos sufren de insuficiencia en su capacidad para predecir los resultados de respuesta para nuevos valores de variables de entrada.

Las herramientas estadísticas a emplear son aquellas que permiten identificar correlación y capacidad explicativa y/o predictiva, apoyadas por mecanismos gráficos y otros estadísticos de soporte. En este sentido, las medias marginales y el análisis de regresión constituyen herramientas muy utilizadas y de fácil manejo.

Por lo general, el análisis de regresión lineal múltiple (RLM) se utiliza para predecir las variables de respuesta cuando la relación teórica entre las variables de respuesta y los factores causales no están claros. Para ello, se utiliza una ecuación polinomial de segundo orden, pero, lamentablemente, este enfoque se limita a menudo a grados bajos, lo que redunda en una pobre estimación de las formulaciones óptimas (Subramanian et al., 2004).

Con el fin de superar las deficiencias de la RLM, las redes neuronales artificiales (RNA) resultan muy útiles cuando se desconoce la dependencia funcional entre las variables de entrada (factores causales) y los resultados de salida (variables de respuesta). Por lo tanto, se utilizan para resolver problemas complejos y para realizar enfoques de optimización. Contrastando con los modelos estadísticos más utilizados, la relación entre variables independientes y dependientes en un modelo de RNA puede ser generada sin considerar una función matemática específica.

Como Ghaffari et al. (2006) definieron, "RNA es un sistema de aprendizaje basado en una técnica computacional que puede simular la capacidad de procesamiento neurológico del cerebro humano". El interés en el uso de RNA para el modelado de las formulaciones y procesos farmacéuticos ha aumentado en los últimos años (Abraham et al., 2008; Yasuda et al., 2010; Ioele et al., 2011; Ajmani et al., 2013; Aksu et al., 2013). Así, Nemati et al. (2013) desarrollaron algoritmos de RNA para predecir tanto el perfil de liberación del fármaco a partir de un conjunto de parámetros de formulación como para determinar los niveles de entrada de estos parámetros para obtener un perfil de liberación deseado del fármaco. El interés por las redes neuronales modificadas, las redes neuronales artificiales transformadas en wavelets (WT-ANN), han sido publicadas por Wu et al. (2013) con el fin de controlar el proceso de preparación de comprimidos de clorhidrato de metformina. Los coeficientes de correlación entre los valores experimentales

y los valores predichos por las RNA para comprimidos que contienen pellets granulados y comprimidos que contienen pellets tradicionales indicaron la excelente capacidad de predicción de éstas (Huang et al., 2015).

Las RNAs son técnicas de modelado interesantes para su uso en la administración de fármacos, ya que no se necesita conocimiento previo del mecanismo del proceso. Sólo los datos de entrada y salida se utilizarán primero para entrenar las neuronas, y posteriormente para validar y probar el modelo resultante (Agatonovic-Kustrin y Beresford, 2000).

1.3.1. Concepto de Red Neuronal Artificial (RNA)

Las RNAs son sistemas informáticos diseñados para simular el comportamiento de las redes neuronales biológicas. Estos fueron concebidos para simular algunas de las características del cerebro que superan a un ordenador, como el reconocimiento de objetos o caras, con flexibilidad para hacer frente a la información incompleta o difusa. Como en el sistema nervioso biológico, las RNA se componen de neuronas que se conectan a través de las fibras nerviosas o dendritas a otras neuronas. Como ocurre biológicamente, los enlaces entre los extremos de las dendritas de dos neuronas se llaman sinapsis y cuando una neurona recibe suficiente estímulo a través de sinapsis de entrada, se activa y emite una señal a través de su axón, que podría activar otras neuronas.

La inteligencia de la RNA no es un concepto nuevo. La capacidad de aprendizaje de las redes neuronales fue propuesta por Morris y Hebb en 1999. El primer modelo de una neurona artificial (Figura 2) se atribuyó a McCulloch y Pitts (1943). En este modelo, las señales que llegan (entradas) x_{1t-1}, x_{2t-1}, x_{Nt-1} pueden ser las salidas de otras neuronas, denominadas t-1. Cada señal de entrada se multiplica por un factor w_{ji} (peso de conexión). Los pesos w_{ji} simulan la fuerza de las conexiones o sinapsis entre las neuronas y pueden ser positivos o negativos. La suma de las entradas ponderadas: $u_{it} = \sum_j^N w_{ji} x_{jt-1}$ se pasa a través de una función de activación (transferencia o propagación): $y_{it} = \Theta(u_{it})$ para producir la salida y_{it} a esa neurona. En este modelo, la neurona *i* sólo produce una salida y_{it}: la neurona se activa cuando la suma de las entradas ponderadas u_{it} es mayor que un valor de umbral dado.

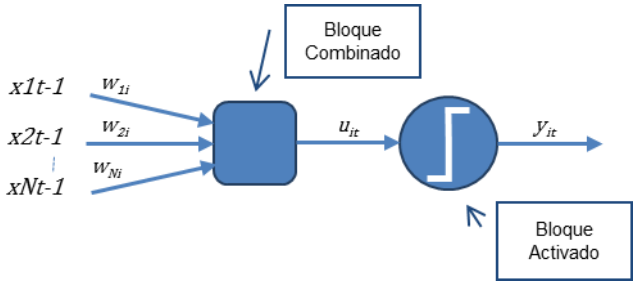


Figura 8. Modelo de neuronas McCulloch-Pitts.

La función de activación propuesta por McCulloch y Pitts (1943) fue una función escalón de Heaviside de la siguiente manera:

$$\Theta(u) = \begin{cases} 1 & if\ u \geq 0 \\ 0 & if\ u < 0 \end{cases}$$

Hoy día, se utilizan muchas funciones de activación diferentes (Figura 3), modificando normalmente los valores de salida de {0, 1} a {-1, 1}.

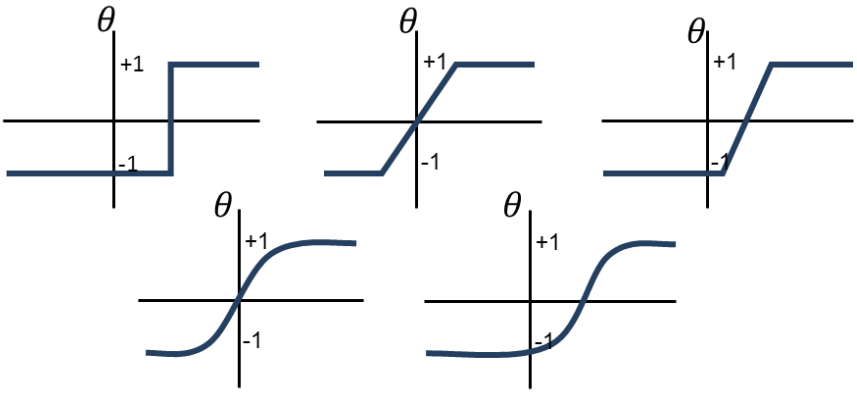


Figura 9. Diferentes funciones de activación.

1.3.2. Arquitectura de la RNA

La forma en que las neuronas están conectadas entre ellas tiene un impacto significativo en el rendimiento de la RNA. Básicamente existen tres tipos de redes: redes en capas, redes recurrentes y redes conectadas lateralmente.

a) *Redes en capas*. En este caso, la red comprende una capa de entrada y una

capa de salida de unidades de procesamiento o neuronas interconectadas a través de una o más capas "ocultas" (Figura 4). El número de neuronas en las capas de entrada y salida está determinado por el número de variables independientes y dependientes, respectivamente. Las neuronas de una capa sólo reciben señales de las neuronas de la capa anterior. Estas redes también se conocen como redes *feed-forward*, perceptrón multicapa o *Multilayer Perceptron Network* (MPN). El primer perceptrón fue propuesto por Rosenblatt (1957), el cual sólo tenía una capa de entrada y una capa de salida. La MPN supera la limitación del perceptrón de una sola capa mediante la adición de una o más capas ocultas.

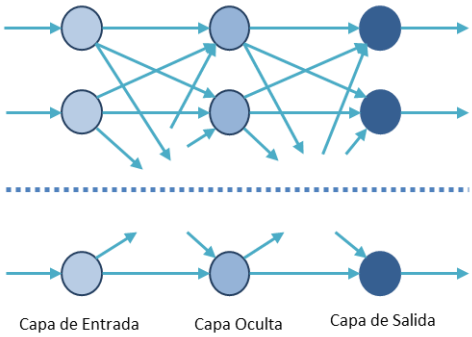


Figura 10. Red en capas.

b) Las *redes recurrentes* son redes en las que cada neurona puede estar conectada entre sí, incluso a sí misma. La red más conocida de este tipo es la red Hopfield (1982) (Figura 5).

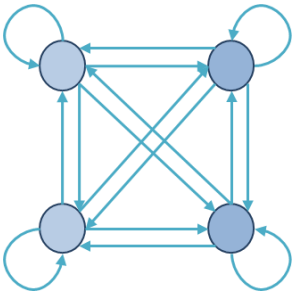


Figura 11. Red recurrente.

c) En las *redes conectadas lateralmente*, las neuronas se distribuyen en una o dos estructuras dimensionales. La red más conocida de este tipo fue diseñada por Kohonen (1974). Se muestra en la Figura 6.

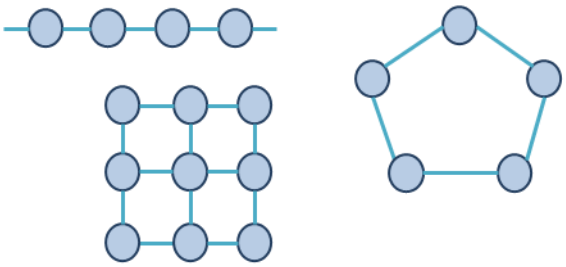


Figura 12. Diferentes configuraciones de redes neurales conectadas lateralmente.

1.3.3. Esquema de aprendizaje

Una RNA se entrena para grabar un conjunto de datos de entrada mediante un ajuste iterativo de los pesos. Este paso es crítico con el fin de identificar las capacidades de la RNA. El mecanismo consiste en alimentar la información de las entradas a través de la red para optimizar los pesos entre las neuronas. En este caso, el proceso de optimización resulta de la propagación hacia atrás del error durante la fase de entrenamiento o aprendizaje (Agatonovic-Kustrin y Beresford, 2000).

Existen dos enfoques de aprendizaje: supervisados y no supervisados por un experto que conoce las respuestas.

a) Aprendizaje supervisado. Un patrón es un conjunto de vectores de entrada y salida. En el campo del diseño farmacéutico, las entradas pueden ser los parámetros de formulación y las salidas son las respuestas obtenidas utilizando esas variables. Cuando se presenta un vector de entrada a la red, su salida se compara con el vector de salida del patrón, usualmente a través de la distancia de Hamming (1950). Después de presentar una serie de patrones a la red, los patrones restantes conocidos pueden usarse para probar el error de la red. Entonces, cuando un patrón desconocido se presenta a la red, puede inferir la salida al vector de entrada. Normalmente, las redes en capas utilizan este tipo de aprendizaje.
b) Aprendizaje no supervisado. En este caso, el objetivo no se conoce previamente. La red adapta sus pesos para encontrar las relaciones o establecer categorías en los patrones. Normalmente, las redes recurrentes y conectadas lateralmente utilizan esta alternativa de aprendizaje.

Como se comentó en el apartado de Introducción general, maleato de timolol (TM) es un antagonista no selectivo del receptor β-adrenérgico, eficaz y bien tolerado, ampliamente utilizado para el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto. Sin embargo, la eficacia de las formulaciones oftálmicas de TM comercializadas está limitada por la biodisponibilidad extremadamente baja del fármaco a nivel ocular. Además, provoca efectos adversos sistémicos los cuales pueden minimizarse utilizando sistemas portadores adecuados. Con el fin de minimizar la absorción sistémica y mejorar la biodisponibilidad ocular de TM, se han desarrollado varios enfoques, centrándose en general en el incremento del tiempo medio de residencia en la superficie ocular (Volotinen et al., 2009; Yu et al., 2015). Otras estrategias han conseguido una mejora en la biodisponibilidad oftálmica utilizando portadores que actúan como potenciadores de permeación (Aggarwal et al., 2005; Siafakaa et al., 2015; Yu et al., 2015). En este sentido, el uso de liposomas elásticos o ultradeformables podría contribuir a un notable incremento de la cantidad de fármaco presente en la membrana de la córnea aumentando también la velocidad de permeación de este proceso.

2. OBJETIVOS

El propósito en este capítulo ha sido desarrollar una formulación de liposomas deformables cargados con TM con las propiedades adecuadas para una administración oftálmica efectiva. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes objetivos parciales:

- Analizar las propiedades de deformabilidad de diferentes formulaciones de transfersomas que contenían TM, elaboradas mediante un procedimiento de extrusión. El estudio se centró en dos parámetros: índice de deformabilidad (ID) y recuperación de grupos fosfatos. Se seleccionaron como variables críticas diversos factores de la formulación que pueden afectar a las propiedades de deformabilidad. Además, se analizó la influencia de los distintos parámetros en las respuestas y consecuentes características de la formulación. Finalmente, se optimizó la composición de los transfersomas aplicando dos enfoques estadísticos: medias marginales y análisis de regresión, seleccionando esta última para estudios posteriores.

- Enfatizar las ventajas de usar RNA para resaltar el efecto de los factores involucrados en las formulaciones de liposomas ultradeformables. Este objetivo se alcanzará, en primer lugar, mediante el modelado de una RNA con esos factores como insumos y sus efectos en las formulaciones como productos. Y, en segundo lugar, se demostrará la efectividad de las RNA con respecto a las metodologías de regresión y de medias marginales, también empleadas.
- Analizar la eficacia *in vivo* de los liposomas convencionales y deformables cuando se administraron en el epitelio corneal de conejo con el fin de evaluar la disminución de la PIO. La diferencia en la composición y propiedades fisicoquímicas de estas vesículas lipídicas pueden contribuir a mejorar la permeabilidad del fármaco y minimizar la dosis a administrar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Timolol maleato (TM), Tween® 20 (Tw20), sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tiocianato amónico, cloruro férrico, cloruro de sodio (NaCl), y lauril sulfato sódico (LSS) fueron adquiridos en Acofarma (España). Acetonitrilo (ACN), cloroformo, metanol, etanol y ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacinil] etanosulfónico (Hepes) se obtuvieron de Panreac Química (España). L-α fosfatidilcolina de la yema de huevo (PC), colesterol (CH) y desoxicolato sódico (Deo-Na) se adquirieron de Sigma-BioChemika (Steinhein, Alemania). Estearilamina (EA) se obtuvo a través de Fluka Biochemika (Suiza). Se utilizó agua desionizada purificada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore). Las membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 800, 200 y 100 nm se adquirieron en Millipore (Condado de Cork, Irlanda).

3.2. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DE TM

Es de vital importancia conocer el comportamiento del TM en distintos medios de disolución y determinar el intervalo de pH de máxima solubilidad de esta molécula. Asimismo, se pretende calcular la solubilidad en los disolventes comúnmente utilizados en la elaboración de liposomas deformables, tales como tampón Hepes pH 7,4 y agua Milli-Q. El Hepes es una molécula zwiteriónica, ampliamente utilizada por su capacidad tampón

en el rango de pH fisiológico 7,2-7,6. Contiene grupos ionizables tanto positivos como negativos, donde los grupos amino aportan la carga positiva, mientras que la carga negativa procede de los grupos sulfónicos y carboxílicos.

Para realizar este ensayo, se han utilizado placas de solubilidad *MultiScreen® Solvinert 0,45 µm* (Millipore) de 96 pocillos. Se depositaron 2,5 mg de TM en cada pocillo y se incorporaron 500 µL del medio de disolución en cada uno de ellos, utilizando como medio, soluciones de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Se tomó como referencia un pocillo con agua Milli-Q y otro con una solución tampón Hepes a pH 7,4. La placa cerrada se mantuvo a 50 rpm durante 2 horas en un baño agitador oscilante (*Baño 320 OR Unitronic OR, Selecta P®*) y se empleó un sistema de filtración a vacío (*Millipore, MultiScreen® HTS Manifold*) para separar el fármaco disuelto para su posterior cuantificación (Figura 7).

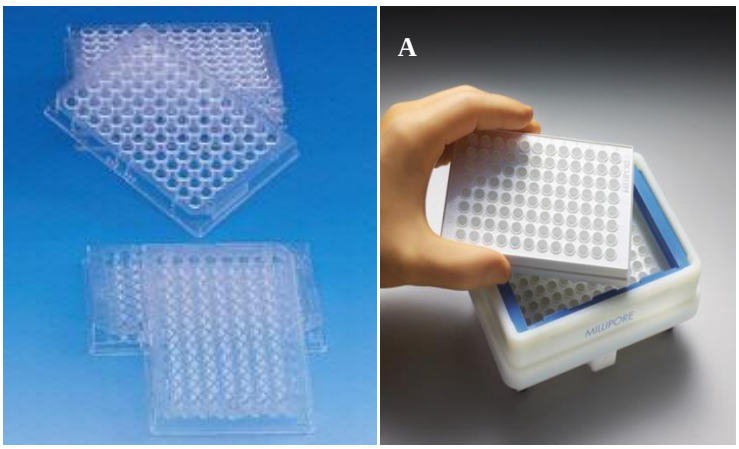


Figura 13. Placa de solubilidad (A) y MultiScreenHTS Vacuum Manifold (B).

3.3. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS DEFORMABLES

Para la elaboración de los transfersomas, se utilizó la técnica de evaporación en capa fina o de Bangham (*TLE, Thin Layer Evaporation*) (González-Rodríguez et al., 2016). La fase lipídica, consistente en una mezcla de PC, CH y EA se disolvió en cloroformo (4,8 mL) en un matraz de fondo redondo. El activador de borde se disolvió completamente con el TM (según formulación) en metanol (3,2 mL). A continuación, ambas soluciones se mezclaron y se procedió a la evaporación de los disolventes orgánicos en un rotavapor (*Büchi Rotavapor R-210* con *Büchi Heating Bath B-491,* Suiza*)* a 58

°C bajo vacío hasta crear una fina película lipídica. La película se mantuvo a presión reducida durante 2 h para eliminar todas las trazas de disolvente, y se hidrató posteriormente con 3 mL de Hepes tampón pH 7,4 / EDTA (1 mM) que contenía 0,5 mg/mL de TM (según formulación) y se sometió a cinco ciclos, consistentes en agitar durante 2 min en vórtex y calentar a 58 °C durante 5 min, hasta que se formaron las vesículas. La temperatura se mantuvo a 58 °C hasta el final del proceso, temperatura por encima de la temperatura de transición gel-líquido (Tc) de las sustancias lipídicas y anfifílicas. Todas las formulaciones (MLV) fueron rápidamente guardadas en viales de vidrio y almacenadas en la oscuridad a 4 °C hasta su posterior uso.

La función del Hepes a pH 7,4 radica en mantener los transfersomas a un pH similar al pH del ojo y EDTA, agente quelante que mantiene la estabilidad de la formulación. El principio activo, TM, será incorporado en la fase oleosa u acuosa según el experimento en la matriz del diseño experimental.

Las vesículas multilaminares obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron sometidas a un proceso de extrusión secuencial con la finalidad de reducir el tamaño de los liposomas y obtener poblaciones unilaminares y más homogéneas. Esta técnica es aplicable en un amplio rango de concentraciones de lípidos (0-400 mg/mL). El proceso se realizó empleando un extrusor *(*LIPEX™ *Termobarrel Extruder),* que es un dispositivo de acero inoxidable que emplea gas nitrógeno para aplicar presiones moderadas (generalmente 100 - 800 psi), forzando de esta forma el paso de las vesículas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. La presión empleada fue de 600 psi y se utilizaron filtros de policarbonato de 0,8 µm y 0,1 µm (200 bar), a través de los cuales se hizo pasar la muestra 3 veces por cada uno de ellos. Antes de la extrusión de 100 nm, las muestras fueron diluidas hasta una concentración de 1,5% p/v de lípidos con respecto al volumen recuperado después de la extrusión de 800 nm.

Para obtener una elevada homogeneidad de los sistemas vesiculares, es conveniente filtrar las muestras sucesivamente por encima de su Tc y emplear filtros con poros de distintos tamaños, empezando por los de mayor dimensión hasta acabar con filtros cuyo poro sea el diámetro deseado de los transfersomas. Este equipo dispone, además, de adaptadores que pueden conectarse a un sistema de recirculación de agua termostatizada mediante una bomba peristáltica (*Rainin Dynamax RP-1*). Gracias a este sistema calefactor, se posibilita la extrusión de lípidos con temperaturas de transición

de fase (gel - líquido cristalino) superiores a la temperatura ambiente, ya que los lípidos en estado de gel no extruirán. Esto permitió que el proceso se llevara a cabo a 60 °C.

En la Tabla 3 se recoge la composición de los sistemas vesiculares elaborados para la etapa de *screening* y la posterior optimización.

Los tipos de vesículas preparadas así como las composiciones de las formulaciones optimizadas para los posteriores estudios de liberación, permeación, estabilidad, morfología y ensayos in vivo se muestran en la Tabla 4. Los liposomas convencionales cargados con TM (CL) se prepararon mediante el procedimiento detallado anteriormente.

Componente	Fase oleosa	Fase acuosa
Fosfatidilcolina (PC)	68 µmoles	-
Colesterol (CH)	20 ó 27 µmoles	-
Deo-Na o Tw20	10 ó 12 mg	-
Estearilamina (EA)	18,56 µmoles	-
Hepes pH 7,4 + EDTA 0,1 mM	-	3 mL
Timolol (TM)	1,5 mg en fase oleosa u acuosa según corresponda	

Tabla 3. Composición de los sistemas vesiculares para el DOE y optimización.

Para preparar liposomas deformables (DL1), se llevó a cabo un procedimiento similar usando PC, CH y Deo-Na como activador de borde. Brevemente, Deo-Na y TM se disolvieron en metanol y PC y CH en triclorometano, mezclando seguidamente estas soluciones orgánicas. De forma similar, se prepararon liposomas deformables que contenían etanol (DL2), el cual formó parte en la hidratación junto al tampón Hepes pH 7,4 (1,5% v/v). Asimismo, se obtuvieron nanoliposomas unilamelares (LUV) por el mismo mecanismo de extrusión detallado anteriormente.

Lote	PC (µmol)	CH (µmol)	Deo-Na (µmol)	TM (µmol)	Etanol (µL)	Agua (µL)	Lípidos totales
CLs	68,0	27,0		4,7		3000	95
DL1	95,45	81,2	7,24	4,7		3000	183,89
DL2	95,45	81,2	7,24	4,7	45	2955	188,59

Tabla 4. Formulaciones optimizadas. Composición de liposomas en 3 mL de solución acuosa. CLs: Liposomas convencionales; DL1: Liposomas deformables; DL2: Liposomas deformables que contienen etanol.

Las formulaciones preparadas para el estudio *in vivo* no se diluyeron con el etanol al 1,5% hasta después de ser extruidas por el filtro de 800 nm. Las formulaciones control de liposomas se obtuvieron del mismo modo. La cantidad de TM incorporada fue 0,5 mg/mL en base a estudios previos, que no se incorporan en este capítulo pero que figurarán en el Capítulo II.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS

3.4.1. Índice de deformabilidad (ID)

El estudio de la deformabilidad resulta especialmente relevante en la caracterización de los transfersomas. La determinación de este parámetro consistió en pasar la dispersión coloidal a través de un gran número de poros de tamaño conocido con el fin de disminuir su tamaño y observar la capacidad que tienen para, tras pasar por el poro, recuperar tanto su tamaño como su forma. La distribución de tamaños de las vesículas se observó tras la extrusión de cada lote, y se compararon con el tamaño de las mismas antes de extruir, con el fin de comprobar de este modo si presentan un mayor grado de flexibilidad y atraviesan el diámetro del poro sin romperse, evitando así la pérdida del principio activo que transportan en su interior. Con esto podría garantizarse la llegada del fármaco al interior del ojo sin quedar retenido en la córnea debido a la ruptura del sistema vesicular.

En el presente trabajo, el ID de los transfersomas elaborados se midió después de la extrusión de las vesículas deformables MLVs. Con este procedimiento se obtuvieron vesículas unilaminares tras pasar las muestras a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 800 nm en un extrusor (Lipex™ *Thermobarrel Extruder*, Northern Lipids Inc., Canadá) bajo flujo de aire (González-Rodríguez et al., 2012). Una vez que las muestras fueron sometidas a ciclos de extrusión, se diluyeron hasta 1,5% p/v de lípidos con respecto al volumen recuperado después del proceso. El ID se calculó a partir del flujo (J) de la muestra a través del filtro y la relación de diámetro entre el tamaño medido vesicular y el tamaño del poro. El J se obtuvo por extrusión de la formulación previamente tratada con el filtro de 800 nm, a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm (rp) aplicando una presión de 600 psi, durante 10 min. El diámetro promedio de los liposomas después de la extrusión (rv) se midió mediante dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS*)* también denominada espectroscopía de correlación fotónica, utilizando un aparato

Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Reino Unido). La elasticidad de los liposomas deformables se obtuvo como sigue:

$$ID = J \cdot \left(\frac{rv}{rp}\right)^2$$

donde J es la tasa de penetración a través de un filtro de membrana (mL/min), rv es el tamaño del liposoma después de la extrusión (nm) y rp es el tamaño de poro de la membrana (nm).

3.4.2. Grupos fosfato

La integridad estructural de las membranas después de la extrusión depende, entre otros factores, de la recuperación de fosfolípidos. Por lo tanto, este estudio se ha centrado en la cuantificación del contenido de PC en las muestras tras el procedimiento de extrusión. Se ha llevado a cabo mediante el ensayo de Stewart (Al-Hanbali et al., 2007). Dicho ensayo se basa en la capacidad de los fosfolípidos para formar complejos con ferrotiocianato de amonio. La ventaja de este método es que la presencia de fósforo inorgánico no interfiere con este ensayo y, por lo tanto, puede utilizarse el tampón PBS u otros tampones fosfato. El protocolo ha sido previamente descrito por Zuidam et al. (2007). En primer lugar, se preparó una solución patrón (0,1 M) de ferrotiocianato de amonio disolviendo 27,03 g de cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_20$) y 30,4 g de tiocianato de amonio (NH·SCN) en agua destilada desionizada hasta 1 L. Simultáneamente, se preparó una solución estándar (0,1 mg/mL, 10 mL) de PC en cloroformo. La reacción de complejación entre las soluciones se realizó en presencia de cloroformo. Después de hacer una curva de calibración (Tabla 5), se aplicó el mismo procedimiento con muestras problema para cuantificar espectrofotométricamente el contenido de fosfolípidos.

Tubo Nº	Estándar (mL)	Cloroformo (mL)	Ferrotiocianato (mL)
0	0,0	2,0	2,0
1	0,1	1,9	2,0
2	0,2	1,8	2,0
3	0,4	1,6	2,0
4	0,6	1,4	2,0
5	0,8	1,2	2,0
6	1,0	1,0	2,0

Tabla 5. Composición de las soluciones para preparar la recta patrón para el método Stewart.

3.4.3. Análisis dimensional: tamaño e índice de polidispersión (IP)

En la estabilidad y el comportamiento físico de los transfersomas, como en cualquier tipo de vesícula, adquiere gran importancia la distribución de los tamaños de los mismos, ya que el tamaño de las vesículas influye notablemente en la estabilidad de los sistemas. De un modo general, se considera que a mayor tamaño, los liposomas son más estables. Este fenómeno se atribuye a un decrecimiento del radio de curvatura y a un estiramiento de la bicapa de tal forma que se expone menos superficie a la acción de componentes externos.

En este trabajo, los parámetros dimensionales se determinaron mediante DLS, previamente mencionada. Esta técnica permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas suspendidas o dispersadas en un medio, y su índice de polidispersión, el cual es indicativo de la distribución de tamaños presentada por la muestra. Los parámetros de medición y cálculo establecidos fueron los siguientes: 1,33 de índice de refracción, temperatura de 25 °C, y agua como vehículo dispersante. La intensidad de la luz láser dispersada por las muestras se detectó en un ángulo de 90° por un fotomultiplicador. Para medir el tamaño de las vesículas se diluyeron 200 µL de dispersión de liposomas con agua purificada para evitar el fenómeno de dispersión múltiple (dilución 1/20 v/v). Para cada lote de dispersión liposomal, se analizaron tres muestras independientes, cada una de las cuales se midió al menos de dos a cinco veces, y fueron analizadas utilizando el método de Contin (Manual de Malvern Instruments). Además, el IP nos permite determinar el nivel de homogeneidad entre diferentes tamaños de partículas. Así, un valor pequeño de IP (< 0,2) indica una población de vesículas homogéneas, mientras que un IP mayor (> 0,3) indica heterogeneidad.

3.4.4. Carga superficial: potencial Zeta (PZ)

La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana. Además, esta carga juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los mismos, ya que los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas (Ramos et al., 2010). La agregación de liposomas es un fenómeno natural e inevitable para membranas sin carga, y

la vía para vencerla es la introducción de carga en la mezcla de lípidos. Así, el efecto de estabilidad podría mejorarse con la incorporación de productos como la estearilamina, por ser éste un agente portador de carga positiva que permite generar la repulsión electrostática suficiente para estabilizar liposomas *in vitro*.

Se ha empleado el PZ (ζ) como una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas.

Para medir el PZ, se diluyeron las muestras con agua purificada y se inyectaron en una célula fotoeléctrica. El movimiento de los liposomas dentro del campo eléctrico permitió precisar su carga eléctrica, determinándose el PZ mediante medidas de movilidad electroforética (μ). La μ se convirtió en PZ por la ecuación de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon$$

Donde, η es la viscosidad y ε es la constante dieléctrica de la solución. Para cada lote, se tomaron al menos cinco muestras independientes, cada una de las cuales se analizó al menos tres veces.

3.4.5. Porcentaje de encapsulación (PdE)

Con objeto de evaluar el porcentaje de fármaco retenido en los liposomas, se eligió el método de centrifugación para separar la fracción de fármaco encapsulada de la no encapsulada, y posteriormente cuantificar el TM por HPLC. La metodología seguida se basó en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, que concluyeron que el método de extracción por centrifugación confiere mejores resultados que el método tradicional de extracción en fase sólida. Este método consiste en la eliminación del fármaco libre por centrifugación (*Eppendorf Centrifuge* 5804 R) a 8.000 rpm a 4 °C durante 60 min (Chimanuka et al., 2002; Fang et al., 2008). El sobrenadante se filtró y se analizó por HPLC, determinando así la cantidad no encapsulada de fármaco. Al precipitado se le añadió 1 mL de una solución de lauril sulfato sódico (LSS) 0,5% p/v para facilitar la destrucción de las vesículas. Tras un proceso de sonicación (*VWR Ultrasonic* durante 10 min y filtrado, se cuantificó por HPLC la cantidad de fármaco encapsulado. Este porcentaje de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PdE\ (\%) = \frac{Q_I}{F_t} \cdot 100$$

donde PdE es el porcentaje de fármaco atrapado, F_t es la cantidad total de TM en la muestra y Q_I es la cantidad de fármaco retenido en las vesículas.

La recuperación total de TM en las formulaciones de vesículas preparadas se calculó a través de la siguiente expresión:

$$Recuperación\ (\%) = \frac{F_t}{F_i} \cdot 100$$

donde F_i es la cantidad inicial añadida de TM.

El equipo cromatográfico (Hitachi Elite LaChrom) estaba equipado con una bomba isocrática L-2130, un conjunto de detector de diodo L-2455 y un auto-inyector L-2200. Para el registro de datos, se utilizó un software de sistema de datos EZChromElite. Las condiciones cromatográficas se optimizaron usando una columna C18 (Merck, RP - 18 LichroCART® 150 mm x 4 mm, 5 µm), un método isocrático con fase móvil de ACN y acetato de sodio (0,05 M) ajustada a pH 4,1, en una relación 30/70 (v/v), flujo de 2 mL/min, volumen de inyección 10 µL, y temperatura del horno de 45 ± 1 °C. El análisis se realizó a 295 nm.

3.4.6. Morfología

CLs y DLs se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (ZEISS LIBRA 120). Todas las muestras se diluyeron previamente con una solución de Hepes (1/100 v/v). A continuación, se dejó secar una gota de la muestra diluida sobre una rejilla microscópica recubierta de cobre (películas de soporte de rejilla de microscopía electrónica de transmisión de 300 mesh Cu). Tras realizar una tinción negativa con acetato de uranilo (1% p/v), el exceso de solución se retiró con agua purificada transcurridos 10 minutos dejando la muestra preparada para su visualización a una tensión de aceleración de 75 kV a diferentes aumentos.

3.4.7. Estimación del coeficiente de reparto del TM

Basado en las propiedades fisicoquímicas teóricas de TM (log P 1,34-1,44, pKa 9,21), es predecible que las moléculas se distribuyan entre la bicapa lipídica y la fase continua acuosa, determinando así la relación de concentración entre ambas fases o coeficiente de reparto del fármaco, como

mostraron autores como Natarayan et al. (2012). Brevemente, volúmenes conocidos de las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 30 min. La cantidad de fármaco presente en el sobrenadante es una medida de la concentración de dicho fármaco en la fase continua (tampón). Dicha cantidad restada de los rendimientos totales de concentración de fármaco, da lugar a la cantidad de fármaco dividido en la bicapa. Así, el coeficiente de reparto del fármaco (PC_D) en liposomas (CL y DL) se estimó usando la siguiente expresión:

$$PC_D = \frac{TM_T - TM_B}{TM_B}$$

donde TM_T es la cantidad total de TM y TM_B es la cantidad de fármaco en tampón.

3.5. DOE

En el presente capítulo, los experimentos se han planificado basándose en el diseño de experimentos, dada la multitud de variables que pueden influir en el proceso de extrusión de los liposomas. En cada estudio concreto, las series de experimentos se agruparon en diseños denominados matrices de experimentos. La selección de una matriz u otra depende del objetivo perseguido y de otras características, tales como naturaleza del problema, información ya conocida del mismo y tipo de información que se desea obtener según el objetivo planteado, número de factores e interacciones que se deben estudiar, complejidad de utilizar cada diseño, facilidad de compresión e implementación, restricciones operativas de coste y tiempo.

En el presente capítulo se aplicó el diseño de experimentos al estudio de la composición de los liposomas deformables, estudiando la influencia de distintas variables en ciertas características de la formulación para obtener vesículas con el mayor ID y la mayor cantidad de principio activo encapsulado. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio de cribado de distintos factores, con el fin de conocer aquellos que influyen significativamente en las respuestas seleccionadas. La secuencia seguida se describe en los siguientes apartados.

3.5.1. Screening: estudio cualitativo de los efectos

En esta fase de *screening* o cribado, se pretende discriminar entre un número determinado de variables y niveles, los que realmente ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas en evaluación. En concreto, se estudia el efecto que tiene el cambio en los niveles de cada variable sobre cada respuesta considerada.

Al plantear por primera vez una serie de experimentos, no es extraño encontrar una larga lista de factores que potencialmente pueden influir. Puesto que el número de experimentos que suele requerir un estudio detallado u optimización de un sistema aumenta exponencialmente con el número de factores estudiados, es necesario reducir la lista de factores a un número manejable.

En el presente trabajo se ha desarrollado un estudio en el que se intenta poner de manifiesto la influencia que ejercen los diferentes parámetros elegidos (variables independientes) sobre las características de la formulación (variables dependientes, respuestas).

3.5.2. Elección del modelo experimental

Para la etapa de cribado, se seleccionó una matriz ortogonal L_{16} de Taguchi. En este caso particular, esta matriz corresponde a un diseño factorial $2^{(5-1)}$ de resolución V. Por lo tanto, los efectos principales serían confundidos con interacciones de cuatro factores (o de orden superior) y las interacciones de dos factores se confundirían con ciertas interacciones de tres factores. Para este estudio, los factores y niveles seleccionados quedan recogidos en la Tabla 6, resultando dieciséis experimentos de la combinación de las variables seleccionadas F1, F2, F3, F4 y F5 en dos niveles diferentes (Matriz L_{16}), los cuales quedan reflejados en la Tabla 7. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con el fin de estimar la variabilidad de los datos y, por lo tanto, los valores de error. Para evaluar los resultados obtenidos, las muestras resultantes se caracterizaron en términos de ID, recuperación de PC, tamaño vesicular, IP, PZ y PdE, constituyendo éstas las variables dependientes del estudio como se mencionó con anterioridad.

Factor	Designación	Nivel (-)	Nivel (+)
Cantidad de colesterol (µmol)	F1	20	27
Cantidad de activador de borde (mg)	F2	10	12
Fase en la que se agregó TM	F3	Fase oleosa	Fase acuosa
Adición de estearilamina	F4	Sí	No
Tipo de activador de borde	F5	Tween® 20	Deo-Na

Tabla 6. (A) Factores seleccionados en el estudio, con la nomenclatura y sus niveles. Los signos (-) indican el nivel inferior del factor y los signos (+) el nivel superior.

En esta etapa, se procedió al análisis de la varianza (ANOVA) y al análisis de las medias (ANOM) para determinar qué factores (principal o interacción entre los parámetros principales) ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas en evaluación.

Lote	F1	F2	F3	F4	F5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+
3	-	-	+	-	+
4	-	-	+	+	-
5	-	+	-	-	+
6	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	-
8	-	+	+	+	+
9	+	-	-	-	+
10	+	-	-	+	-
11	+	-	+	-	-
12	+	-	+	+	+
13	+	+	-	-	-
14	+	+	-	+	+
15	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	-

Tabla 7. Matriz ortogonal de Taguchi L_{16} utilizada en este estudio. (-): Nivel inferior del factor. (+): Nivel más alto del factor. F1: Cantidad de colesterol (µmol). F2: Cantidad de activador de borde (mg). F3: Fase en la que se agregó TM. F4: Adición de estearilamina. F5: Tipo de activador de borde.

3.6. OPTIMIZACIÓN

Por último, se han aplicado técnicas de optimización para obtener una respuesta predecible en función de las propiedades deseadas. Se han utilizado como herramientas matemáticas en este escenario las medias marginales, el análisis de regresión y las redes neuronales. La elección de un modelo de regresión no lineal está particularmente basada en la elección del

diseño de experimentos seleccionado, capaz de determinar los efectos de los principales factores e interacciones entre ellos. La selección de otra función polinomial de orden superior incrementaría el ajuste del modelo a los datos de entrada, pero la fiabilidad de las predicciones se reduciría. Por tanto, el ajuste de cada respuesta se justificó mediante el ajuste del coeficiente R-cuadrado. En algunos casos, se requirió una transformación logarítmica de la respuesta. Esto ocurrió para la respuesta del tamaño de vesícula (antes y después de la extrusión), ya que se observaron patrones en términos de residuos. Una vez obtenidas las funciones de regresión, se optimizaron individualmente las respuestas, utilizando el paquete de software Matlab Q2. Finalmente, se aseguró la robustez de las formulaciones optimizadas con los experimentos de confirmación. Las formulaciones finales con las condiciones óptimas se repitieron para verificar la idoneidad de la metodología seguida.

Tras someter los resultados a un tratamiento estadístico, se determinaron las variables que presentaron mayor influencia en la formulación, y qué interacción o interacciones entre los componentes influyeron de manera más significativa para un determinado factor fijo. Concretando para nuestro objetivo las características óptimas que debe presentar la formulación, se desarrollaron nuevos experimentos que nos permitieron llegar a la mejor combinación de factores y, por tanto, a la formulación óptima capaz de encapsular el máximo contenido en TM junto con el mejor ID asociado.

Para llevar a cabo la optimización de las distintas respuestas, se estableció como criterio el deseo de maximizar o minimizar cada una de ellas (Tabla 8).

Respuesta	Objetivo
Tamaño	Minimizar
IP	Minimizar
PZ	Minimizar
PdE	Maximizar
Recuperación PC	Maximizar
ID	Maximizar

Tabla 8. Objetivo para cada respuesta estudiada.

Tras desarrollar las distintas etapas de optimización, se realizarán los experimentos de confirmación, determinando, a su vez, el valor de las respuestas en dichas formulaciones y comparándolas con las elaboradas en los estudios previos.

3.6.1. Medias marginales

Cuando se realiza un proceso o un experimento, se pueden derivar de él una serie de variables a conocer (*x, y*, etc.). Si, a título de ejemplo, se estudian dos variables, la representación de los valores obtenidos para cada experimento en forma de tabla, sería como la que se muestra en la Tabla 9. Si las tablas están compuestas por variables cuantitativas, serían de correlación, mientras que, si son de variables cualitativas, se trataría de tablas de contingencia.

x/y	y_1	y_2	...	y_p
x_1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1p}
x_2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2p}
...	...	....	...	...
x_k	n_{k1}	n_{k2}	...	n_{kp}

Tabla 9. Ejemplo de una tabla de correlación.

De las tablas de correlación o de las de contingencia se puede extraer información de cada variable de forma independiente. A la distribución unidimensional extraída de una variable bidimensional se le denomina *distribución marginal*. El nombre deriva del hecho de que las frecuencias de distribución marginal (*f*) se obtienen sumando en el margen derecho o el inferior de la tabla de correlación (Tabla 10).

A las medidas tales como la media, varianza, etc., calculadas a partir de una distribución marginal se les aplica el calificativo de marginal. Por lo tanto, la media marginal para *x* e *y* sería:

$$\bar{x} = \left({}^{1}/_{N}\right) \cdot \sum x_1 n_1 = \sum x_i f_i$$

$$\bar{y} = \left({}^{1}/_{N}\right) \cdot \sum y_1 n_1 = \sum y_i f_i$$

siendo:

$$f_i = {}^{n_i}/_{N} \qquad\qquad f_j = {}^{n_j}/_{N}$$

Distribución marginal primera			Distribución marginal segunda		
X	n_i	f_i	***Y***	n_j	f_j
x_1	n_{1i}	f_{1i}	y_1	n_{1j}	f_{1j}
x_2	n_{2i}	f_{2i}	y_2	n_{2j}	f_{2j}
…	…	…	…	…	…
…	…	…	…	…	…
x_k	n_{ki}	f_{ki}	y_p	n_{jp}	f_{pj}
SUMA	N	1	**SUMA**	N	1

Tabla 10. Ejemplo de una distribución marginal para x e y.

3.6.2. Análisis de regresión

Como es bien sabido, el análisis de regresión permite establecer la relación que se produce entre una variable dependiente "Y", y un conjunto de variables independientes (X_1, X_2, … X_K). Es un proceso estadístico usado para estimar las relaciones entre variables. Ayuda a entender cómo el valor de la variable dependiente varía al cambiar el valor de una de las variables independientes, manteniendo el valor de las otras variables independientes fijas. El análisis de regresión es ampliamente utilizado para la predicción y previsión, donde su uso tiene superposición sustancial en el campo de aprendizaje automático. El análisis de regresión se utiliza también para comprender cuales de las variables independientes están relacionadas con la variable dependiente, y explorar las formas de estas relaciones. Un análisis de regresión genera una ecuación para describir la relación estadística entre uno o más predictores y la variable de respuesta y para predecir nuevas observaciones (Rodríguez-Jaume y Mora Catalá, 2001). La anotación matemática del modelo o ecuación de regresión lineal múltiple es la que sigue:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_kX_k + \mathrm{e}$$

donde Y es la variable a predecir; a, b_1X_1, b_2X_2... b_kX_k, son parámetros desconocidos a estimar; y "e" es el error cometido en la predicción de los parámetros.

3.6.3. Redes neuronales artificiales

3.6.3.1. Modelado de la RNA

A partir de las topologías de red disponibles referidas en la Introducción, se eligió una *MPN feed-forward*, debido a la mayor capacidad de respuesta de esta RNA ante problemas de heterogeneidad y no linealidad significativos. Una implementación diferente es la propuesta por Abraham et al. (2008). En esta implementación, la salida de un conjunto de RNA es una combinación de las salidas de las diferentes redes. Otro enfoque es el Sistema Neuro Fuzzy, que consiste en redes neuronales combinadas y sistemas difusos (Grosan et al., 2006). Estas formas de utilizar las RNA se han evitado porque imponen una gran complejidad de arquitectura atribuible a su configuración y al ajuste de sus parámetros.

El uso del *MPN feed-forward* para diseñar la arquitectura de la RNA ha sido ampliamente extendido. En esencia, la estructura consta de una capa de entrada, una o más capas ocultas y una capa de salida. Con respecto a las capas ocultas, el uso de al menos una capa oculta permite a la RNA describir sistemas no lineales y proporcionar una predicción adecuada, como postuló Woolfson et al. (2010). Cada capa tiene algunas unidades neuronales que están interconectadas por sinapsis. Cada conexión tiene asignado un peso. De esta manera, variando los valores de peso, se genera una relación no lineal entrenando la RNA, lo que puede minimizar el error cuadrado entre los datos estimados y experimentales en la capa de salida.

Por lo tanto, como MPN se utilizó un aprendizaje supervisado, mediante el uso de la regla de retropropagación o la regla delta generalizada (Widrow y Hoff, 1960). En este método, se presenta un patrón *p* a la red cuyos pesos iniciales han sido elegidos aleatoriamente. El error implicado (E_p) en cada una de las neuronas *n* se calcula como sigue, comparando la salida o_{pk} de la neurona *k* con la salida deseada d_{pk} correspondiente a ese patrón de entrada *p*:

$$E_p = \frac{1}{n}\sum_{k=0}^{n-1}\left(d_{pk} - o_{pk}\right)^2$$

El error medio de la red (E) para todos los patrones *m* es:

$$E = \frac{1}{m}\sum_{p=0}^{m-1} E_p$$

A continuación, los pesos de las conexiones entre la capa anterior y la capa de salida se ajustan en una cantidad que es proporcional al gradiente del error. Esta cantidad es la tasa de aprendizaje:

$$\Delta w_{ik} = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ik}}$$

Con el fin de reducir las oscilaciones durante la fase de aprendizaje y, en consecuencia, aumentar la tasa de convergencia, se utiliza un *término de momento* (θ). Este término debe ser lo suficientemente alto para reducir las oscilaciones, pero no tan alto como para prevenir el aprendizaje. La variación total en el peso de la conexión es:

$$\Delta w_{ik}(t) = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ik}} + \theta \Delta w_{ik-1}$$

Como se discutió anteriormente, el aprendizaje está estrechamente ligado al número de neuronas en la capa oculta. Por lo tanto, si este número de neuronas es demasiado alto, el tiempo de aprendizaje será mayor y, posiblemente, la red estaría sobreentrenada. Esto conducirá a una red que ha aprendido incluso características particulares en el conjunto de patrones de entrenamiento, pero no puede generalizar cuando se presentan nuevos patrones.

3.4.6.2. Configuración de RNA

En la configuración de la MPN, deben ser consideradas las siguientes características: las capas de entrada y salida, el número de capas ocultas, el número de neuronas en cada una de estas capas, la función de activación y el porcentaje de patrones conocidos que se utilizarán para entrenar la red. Los patrones restantes se utilizarán para probar el error una vez que la red haya sido entrenada.

La red comprende los siguientes componentes:

- El número de neuronas en las capas de entrada y salida, que será determinado por el número de variables independientes y dependientes, respectivamente.
- El número de capas ocultas, como las formas de interconexión entre la capa de entrada y salida de las unidades de procesamiento. Este componente es definido por el usuario, con el objetivo de maximizar la capacidad de generalización sin un gran aumento de la complejidad.

- El número de neuronas en la capa oculta. Con el fin de seleccionar el número de neuronas ocultas, se comenzó con pocas neuronas ocultas y el número de neuronas se incrementó gradualmente hasta lograr una red de error mínimo para el conjunto de datos de prueba.

En el presente estudio, la RNA se configuró de la siguiente manera:

a) Capa de entrada, constituida por cinco neuronas, correspondiente al número de factores de entrada del DOE: F1, F2, F3, F4 y F5. Se utilizaron dos niveles diferentes para cada unidad de capa de entrada.

b) Capa de salida, incluye ocho neuronas, que se ocupan de las cuatro variables de salida (respuestas) del DOE, antes y después del proceso de extrusión. Se utilizó un perceptrón multicapa con un algoritmo de retropropagación como RNA para predecir cuatro variables de respuesta diferentes, tales como la distribución del tamaño vesicular (Y1), la carga superficial (Y2), el IP (Y3) y el PdE de TM (Y4). Estos valores se consideraron antes y después del proceso de extrusión, que condujo a ocho neuronas en la capa de salida.

c) Número de capas ocultas. Se eligió una capa oculta en este estudio porque no se observó una diferencia significativa en la mejora del rendimiento al aumentar el número de capas ocultas a dos o tres.

d) Patrones. El estudio se inició con la matriz de datos obtenida mediante el DOE a través de Taguchi L_{16} (Tabla 8) como herramienta de selección, con el fin de identificar factores de formulación significativos. Cada ejecución se replicó tres veces, por lo que se probaron 48 experimentos, cada uno con un conjunto de variables de entrada y sus correspondientes variables de respuesta. Consecuentemente, hubo 48 patrones disponibles para entrenar la red.

Los patrones de entrenamiento de la RNA se ajustaron a los datos obtenidos según la matriz ortogonal de Taguchi L_{16}. Los datos se dividieron en un subconjunto de entrenamiento seleccionando los 48 patrones. En esta etapa, se realizó un ANOVA estadístico para determinar qué factores de prueba (principal o interacción entre parámetros principales) fueron estadísticamente significativos para cada respuesta, seleccionando aquellos niveles que producen un efecto sobre la respuesta claramente superior al efecto introducido por el error experimental.

e) Número de neuronas en la capa oculta. Este parámetro se estableció realizando la experimentación con diferentes números de neuronas ocultas. El ensayo se inició con cinco neuronas ocultas que se incrementaron gradualmente hasta que se obtuvo un error mínimo para los datos experimentales. Con el propósito de lograr el número óptimo de neuronas ocultas, la red se probó 10 veces con 5 a 14 neuronas en la capa oculta.

f) Porcentaje de patrones utilizados en la formación de RNA. El objeto de este estudio ha sido determinar el porcentaje adecuado de patrones utilizados para capacitar la red y validar su funcionamiento. Para ello, se analizaron los porcentajes de patrones 70%, 80% y 90% de 48 experimentos disponibles.

g) Función de activación. Esta red fue programada en lenguaje C y Windows. La función de activación debe ser derivable y se seleccionó un modelo logístico para considerar la posibilidad de no linealidad en la relación entre las entradas y las salidas:

$$f(z) = \frac{1}{1 + e^{z}}$$

Siendo z la suma ponderada de las entradas de la neurona.

h) Otros parámetros de configuración:

• Condición de parada 1: 10.000 iteraciones. La red no continuará actualizando los pesos de las conexiones después de 10.000 iteraciones, con el fin de reducir el tiempo de cada experimento.

• Condición de parada 2: error = 0,01. La red detendrá la actualización de pesos cuando el error RMS (*Root Mean Square*) entre el patrón de salida obtenido y el patrón de salida conocido sea menor o igual al 1 por ciento. Este valor es alcanzado por la red con un alto número de iteraciones y se elige para evitar el sobreajuste de los pesos al conjunto de patrones de entrenamiento.

• Condición de parada 3: Gradiente = 0,00001. Este valor corresponde al valor de error óptimo, por lo que los pesos no pueden mejorar la respuesta de la red.

• Tasa de aprendizaje: α = 0,1. La cantidad de pesos modificada para cada iteración fue 0,1.
• Momentum: 0,9. Este valor reducirá las oscilaciones en los pesos en un 10%, con el fin de no repercutir en el aprendizaje.

3.7. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VITRO

Los estudios de permeación *in vitro* se realizaron utilizando celdas de difusión de Franz dispuestas en un equipo de permeación (SES EmbH *Analyesysteme*). El compartimento receptor de la célula de difusión se conectó a una red doble de tubos conectada a un baño de agua termostatizado y se mantuvo a 35 °C durante todo el ensayo. Se utilizaron membranas sintéticas de nitrato de celulosa de 0,2 µm (47 mm de diámetro) como barrera de permeabilidad, con un área de difusión de 3,14 cm^2. Para efectuar el estudio, las membranas se hidrataron con solución de Hepes pH 7,4 durante 1 h, y posteriormente se impregnaron con una solución de gelatina (12% p/v) para simular las condiciones del epitelio corneal de alto contenido en proteínas en el estroma (principalmente colágeno), ya que es la membrana más ancha y principal de la córnea (que supone el 90% del contenido total). Se seleccionó la gelatina a esta concentración como modelo de proteína ya que la hidrólisis parcial de colágeno es capaz de generar una flexibilidad gelificada (Lee et al., 2004). El compartimento receptor de la celda de difusión se llenó con 16 mL de fluido lagrimal artificial ($NaHCO_3$ 0,218% p/p, NaCl 0,678% p/p, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 0,0084% p/p, KCl 0,138% p/p) y se mantuvo en agitación continua. La membrana de celulosa previamente hidratada se montó entre el compartimento donador y el receptor, colocando 1 mL de cada muestra en la superficie de la membrana en el compartimento donador. La celda de difusión se mantuvo sellada con parafilm en todo momento para evitar la pérdida de humedad. A intervalos de tiempo predeterminados (30, 60, 120, 240, 360 y 1440 min), se retiraron alícuotas (1 mL) de la cámara receptora, reponiendo inmediatamente un volumen igual de tampón con el fin de mantener el volumen inicial. Las muestras se cuantificaron por HPLC. Como control se utilizó una solución de TM 0,5% p/v. La permeación se determinó cuantificando la cantidad de fármaco en la cámara receptora. Cada experimento se realizó por triplicado. La cantidad acumulada media de fármaco permeado por unidad de superficie de la membrana se representó en función del tiempo. Así, se calculó la tasa (pendiente de la parte lineal del gráfico) dividida por el área disponible para difusión (A), generando el coeficiente de permeabilidad (P).

$$P = \frac{\frac{dQ}{dt}}{A{\cdot}Cd}$$

A = área de difusión (3,14 cm^2); dQ/dt = cantidad de fármaco / tiempo; Cd = Concentración de fármaco en el compartimento donador. El flujo (J) se calculó de la siguiente manera:

$$J = P \cdot Cd$$

3.8. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

La estabilidad física de las vesículas y su capacidad para retener el fármaco (es decir, el fármaco encapsulado) se evaluaron durante 1 mes a una temperatura de 2-8 °C. Para ello, se retiraron muestras periódicamente para determinar el PdE, tamaño de la vesícula, IP y PZ.

3.9. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Los ensayos de liberación de TM a partir de los sistemas de liposomas se llevaron a cabo mediante el método de diálisis. Para ello, se colocó 1 mL de dispersión de liposomas en una bolsa de diálisis (*Spectra/por membrana MWCO: 12—14000, Spectrum Laboratories, EE.UU.*), previamente hidratada, sellando ambos extremos con un clip de diálisis. El dispositivo se incubó en 50 mL de lágrimas artificiales ($NaHCO_3$ 0,218% p/p, NaCl 0,678% p/p, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,0084% p/p, KCl 0,138% p/p), manteniendo la velocidad de agitación a 100 rpm y 37 °C (*IKA® RT10*), reproduciendo así parcialmente las condiciones biológicas (Rathore et al., 2010; Bhowmik et al., 2011). A intervalos de tiempo predeterminados, se recogieron alícuotas del medio de disolución, reponiendo siempre con el mismo volumen de medio fresco. La cantidad de fármaco liberado con el tiempo se cuantificó por HPLC.

3.10. ESTUDIOS DE EFICACIA HIPOTENSORA *IN VIVO*: DETERMINACIÓN DE LA PIO

En este experimento se han utilizado 10 conejos normotensos neozelandeses, machos, blancos, no sedados, de 2-2,5 kg de peso cada uno. Fueron revisados los procedimientos de manejo animal basados en la resolución sobre el uso de animales en la investigación, establecidos por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO), la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/CEE) y el Comité institucional de atención y utilización de los animales de investigación, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina), y se cumplieron

exhaustivamente todos los protocolos. Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales, teniendo libre acceso a alimentos y agua, y se mantuvieron en un ciclo controlado 12/12 h de luz/oscuridad. Las formulaciones se aplicaron en los 10 conejos (n = 20 ojos) y cada control se evaluó en 5 de ellos (n = 10 ojos). La PIO se midió con un tonómetro de rebote (*Tonovet, Tiolat, Helsinki, Finlandia*), técnica tópica que no requiere anestesia. Para cada ojo, la PIO se fijó al 100% con dos lecturas basales tomadas 30 minutos antes e inmediatamente después de la instilación. A continuación, se aplicó una sola dosis de la formulación (50 µL) a ambos ojos. Se realizaron determinaciones de la PIO una vez, cada hora y durante las siguientes 7 horas. Los conejos control recibieron formulaciones sin el agente hipotensor. El protocolo de administración incluyó, al menos, un período de lavado de 48 h entre experimentos.

3.11. PRUEBAS DE IRRITACIÓN OCULAR

3.11.1. Evaluación con el método de Draize modificado

La posible irritación ocular y/o los efectos dañinos de la formulación desarrollada, en comparación con una solución de LSS en PBS al 2% p/v (control positivo), se evaluaron utilizando una versión ligeramente modificada de la prueba de Draize (Draize et al., 1944). Para realizar este ensayo, se utilizaron doce ojos de seis conejos blancos albinos machos, de 2,0-2,5 kg de peso. Se instiló un volumen de 50 µL de las formulaciones en ensayo en el saco conjuntival de cada ojo (la capacidad del saco conjuntival del conejo es ~ 30 µL). Otros seis conejos fueron separados y utilizados como grupo control, y recibieron una solución salina normal (NaCl 0,9% p/v) instilado en cada ojo. Las evaluaciones previas y posteriores a la exposición de los párpados, la conjuntiva, la córnea y el iris se realizaron mediante observación externa con iluminación, usando la lámpara de hendidura de bio-microscopía (*Kowa SL-14*). Para proceder a la observación, se instiló una gota de fluoresceína sódica (0,25% p/v) para contrastar la posible lesión corneal. La puntuación de irritación o daño ocular se anotó para cada observación a los 30, 60, 120 y 180 min, según la escala recogida en la Tabla 11.

Valor	Efecto de la formulación
0-8	Sin irritación
9-20	Irritación leve
21-40	Irritación leve a moderada
41-60	Irritación moderada
61-80	Herida severa
81-110	Herida muy severa

Tabla 11. Puntuación de lesión corneal potencial.

3.11.2. Examen histológico

En base a los resultados obtenidos anteriormente y con el objetivo de examinar los efectos producidos sobre la estructura e integridad ocular, se observó que la irritación máxima provocada por la solución de LSS se produjo a los 30 minutos tras la instilación. En ese momento, el animal fue sacrificado, se retiraron las córneas y se realizó un examen histológico.
Para obtener un punto de referencia, el efecto de las soluciones de NaCl al 0,9% p/v y LSS en PBS al 2% p/v se evaluaron en las mismas condiciones experimentales. Después de la incubación, las córneas se lavaron con PBS y se fijaron inmediatamente con una solución de formalina al 8% p/v. El material se deshidrató con un gradiente de alcohol, se puso en parafina fundida y se solidificó en forma de bloque. Se realizaron cortes transversales (< 1 µm), se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se observaron microscópicamente para analizar si se había producido cualquier modificación patológica (Baydoun et al., 2004).

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba T de Student para comparar las diferencias entre los grupos. Los resultados se dan como media ± DE y los resultados con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las diferencias estadísticas entre dos valores medios se evaluaron por el test T de Student de dos vías, y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) cuando fue necesario. Los resultados obtenidos se tomaron como significativamente diferentes con $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DE TM

Los resultados, de acuerdo con los datos revisados en bibliografía respecto a la solubilidad de TM en diferentes medios de disolución, revelaron que el fármaco obtiene un máximo de solubilidad en el rango de pH 3-4, como refleja la Figura 8. Este hecho puede atribuirse a que el fármaco se encuentra en forma de sal maleato y su solubilidad en este rango de pH, aumenta. Por el contrario, al incrementar el pH, la solubilidad disminuye por encontrarse en su forma de base libre. Estos resultados están en concordancia con los resultados de otros autores (Mohammedi et al., 2011), los cuales estudiaron la solubilidad de TM en diferentes medios y demostraron que sigue el siguiente orden: pH 4,0 > agua destilada > tampón pH 7,4 > tampón pH 8,0. Asimismo, Bundgaard et al. (1988) afirmaron que los ésteres alquil, cicloalquil y aromáticos de TM, debido a su carácter básico, son más solubles en soluciones acuosas de pH 3-6.

Además, se determinó la solubilidad del fármaco en Hepes 7,4 encontrándose un valor de 2,83 mg/mL y en agua destilada 2,74 mg/mL. Así, se tomó el dato empírico de solubilidad de TM en el tampón como punto de partida para establecer la concentración a ser incorporada en la fase hidrófila del liposoma.

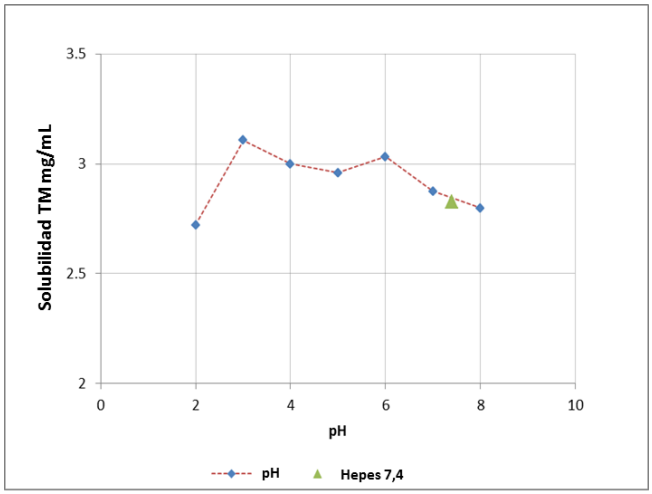


Figura 14. Representación gráfica de la concentración de TM solubilizado frente a diferentes pH del medio.

4.2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES VARIABLES EN LA FORMULACIÓN

Con objeto de determinar si el valor de los efectos es o no significativo, se fijaron unos límites de decisión: límite superior de control (UDL) y límite inferior de control (LDL); fuera de ese margen se considera que el efecto es significativamente mayor que el error cometido. Los valores para estos límites de decisión se encuentran recogidos en cada una de las gráficas de este apartado.

4.2.1. Tamaño e IP

Respecto al tamaño, según el ANOM, se puede apreciar en la Figura 9, que los cinco factores estudiados tuvieron significación estadística en la respuesta evaluada antes y después de la extrusión, ya que los valores obtenidos se encuentran fuera de los límites de error establecidos en el diseño.

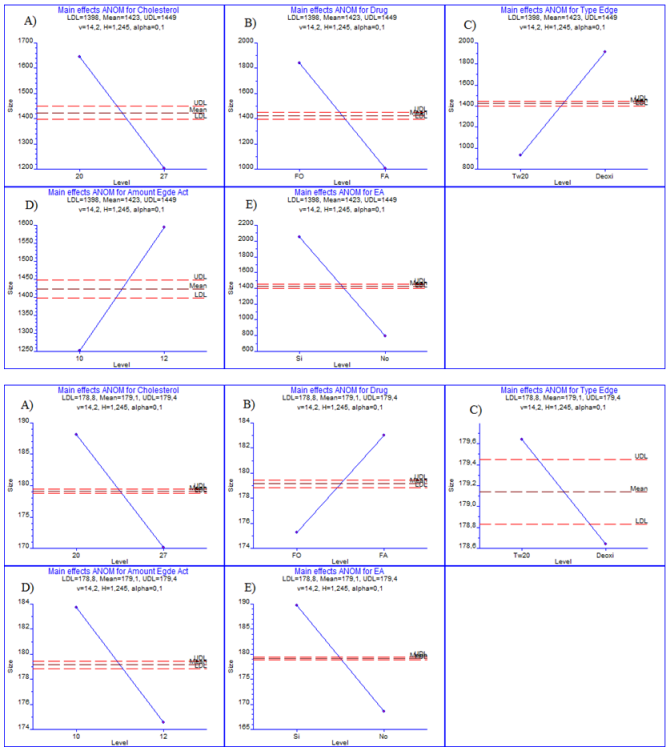


Figura 15. Gráficos ANOM, resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta tamaño vesicular antes (superior) y después (inferior) de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

Según el ANOM, al comparar la influencia de los factores antes y después de la extrusión, el nivel superior de CH y la ausencia de EA, influyeron favorablemente en la obtención de un tamaño de vesícula menor en ambos casos. La cantidad de CH (A) está relacionada de forma inversamente proporcional con la respuesta analizada. Este hecho podría atribuirse a que concentraciones superiores de CH conducen a un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas fosfolipídicas, disminuyendo así su tamaño, así como su libertad de movimiento, con el consiguiente incremento en la rigidez de la membrana. Respecto al activador de borde, antes de la extrusión se concluyó que el más favorable fue Tw20 en la menor cantidad, mientras que después de la extrusión, para obtener el menor tamaño de vesícula, requería el activador Deo-Na y a la mayor concentración. Teniendo en cuenta que tanto la estructura de ambos tensioactivos como la diferencia de carga que aportan a la formulación pueden intervenir en la diferencia de tamaños obtenida, este resultado es importante considerarlo una vez se intente optimizar el proceso de extrusión. La presencia de EA (E), como cabría esperar, da lugar a vesículas de mayor tamaño, debido al elevado peso molecular de la EA en sí. Además, analizando los resultados de ANOVA (Anexo I), la EA fue el factor (H) individual que más influyó estadísticamente en el tamaño antes y después de la extrusión.

En cuanto al IP, a continuación, en la Figura 10 se recogen los efectos principales para cada factor.

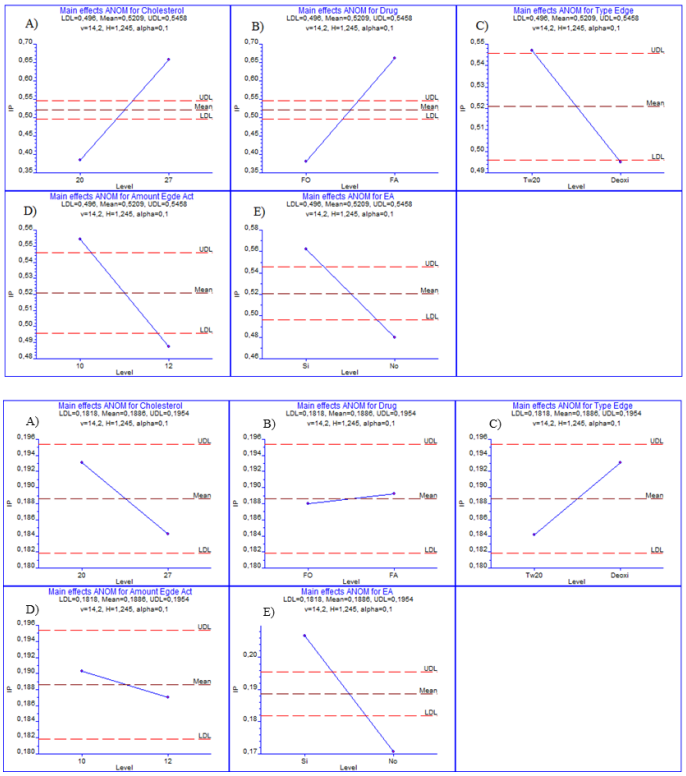


Figura 16. Gráficos ANOM, resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta IP antes (superior) y después (inferior) de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

Antes de la extrusión, todas las variables mostraron significación estadística excepto el tipo de activador de borde. Los factores de cantidad de CH y la incorporación del fármaco están directamente relacionados. Por el contrario, tanto el tipo de activador como la cantidad del mismo, al pasar al nivel superior, disminuye el IP. Mediante el análisis de la varianza (Anexo I), se observaron diferencias significativas en la respuesta IP, siendo la incorporación del fármaco en una fase u otra (factor D) la que tiene una mayor significación estadística y porcentaje de contribución seguido de la cantidad de CH (A). Sin embargo, al analizar el IP después de la extrusión, sólo se observó significación estadística con la presencia de EA, de forma que cuando ésta se incluye, se obtiene un IP más desfavorable, puesto que aumentan sus valores. Esto es indicativo de que el proceso de extrusión dio lugar a poblaciones de vesículas homogéneas por igual, independientemente de la composición. Los factores con un mayor porcentaje de contribución

respecto a la respuesta de IP después de la extrusión, como cabría esperar, están relacionados con la EA, la presencia o no de ésta (factor H) con un 36%, seguido de la interacción de ésta con el tipo de activador (G) contribuyendo con un 22% (Figura 11).

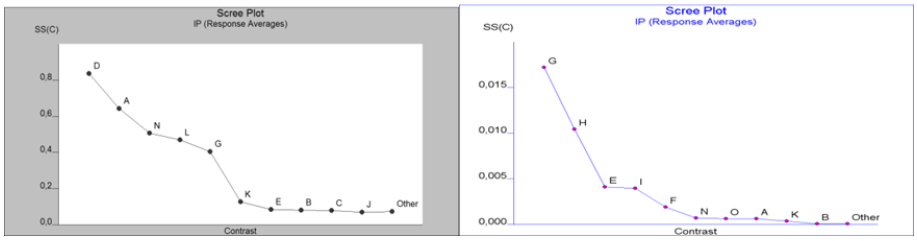


Figura 17. Contribución de los distintos factores a la respuesta IP, antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión. Se representan en ordenadas la suma de los cuadrados y en abscisas los efectos. A: F1; B: F2; C: F1xF2; D: F3; E: F1xF3; F: F2xF3; G: F4xF5; H: F4; I: F1xF4; J: F2xF4; K: F3xF5; L: F3xF4; M: F2xF5; N: F1x F5; O: F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

4.2.2. Potencial Zeta

En la Figura 12 se observa que todos los factores estudiados se encuentran fuera de los límites de decisión, por lo que puede afirmarse que todos ellos ejercieron un efecto significativo.

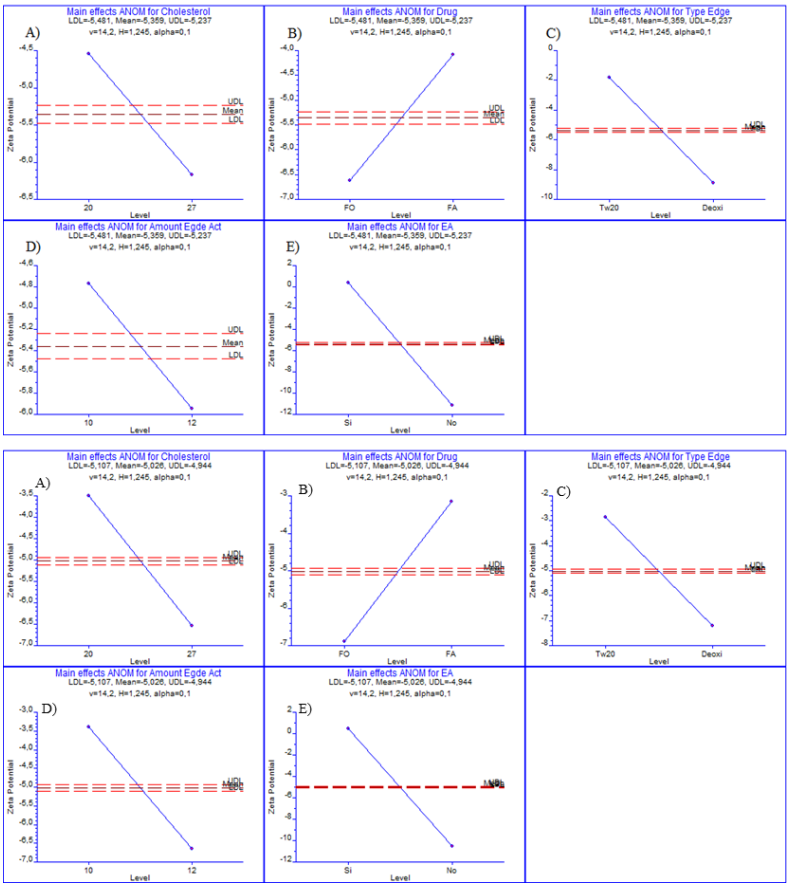


Figura 18. Gráficos ANOM resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta PZ antes (superior) y después (inferior) de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

En las gráficas A, C, D y E puede apreciarse que antes y después de la extrusión, los niveles superiores de estos parámetros dan lugar a valores de PZ más negativos. Por el contrario, en la gráfica B, el nivel superior conlleva valores de potencial menos negativos.

Los resultados del análisis de la varianza (Anexo I) confirmaron que el factor que ejerció un efecto más significativo y con mayor grado de contribución para el PZ en ambos casos, fue la EA (factor H). Este resultado queda recogido también en la representación del grado de contribución de cada factor en la respuesta (Figura 13). Se puede observar en ella que el paso del nivel inferior al superior en cuanto a la presencia o no de EA es el factor que más contribuye con diferencia a dicha respuesta.

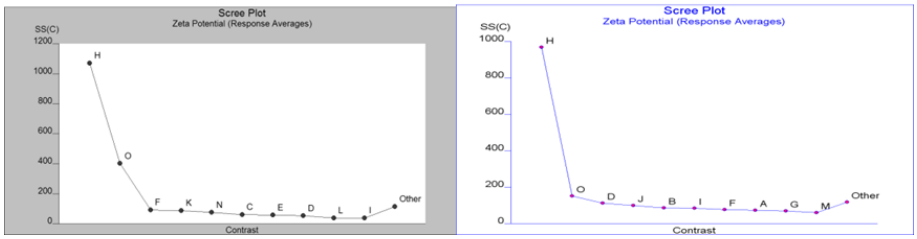


Figura 19. Contribución de los distintos factores a la respuesta potencial zeta antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión. Se representan en ordenadas la suma de los cuadrados y en abscisas los efectos. A: F1; B: F2; C: F1xF2; D: F3; E: F1xF3; F: F2xF3; G: F4xF5; H: F4; I: F1xF4; J: F2xF4; K: F3xF5; L: F3xF4; M: F2xF5; N: F1x F5; O: F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

4.2.3. PdE

Como muestra la Figura 14, puede decirse que el aumento de la eficacia de encapsulación antes y después de la extrusión, se encuentra directamente relacionado con la incorporación del fármaco en la fase acuosa, el uso de Deo-Na como tipo de activador y el nivel superior de cantidad de este compuesto. La explicación a este hecho puede radicar en que, al aportar este componente carga negativa a la bicapa, conduce con frecuencia a aumentar las fuerzas de repulsión en la estructura, incrementando el tamaño del compartimento acuoso interno de los liposomas. Siendo el TM un compuesto hidrófilo, el aumento del tamaño del núcleo acuoso contribuye al aumento de la cantidad de fármaco encapsulado en las vesículas, como se observa en este estudio y como han demostrado otros autores (Maurya et al., 2010). Sin embargo, existe una discrepancia entre la presencia o no de EA, y el nivel superior o inferior de CH.

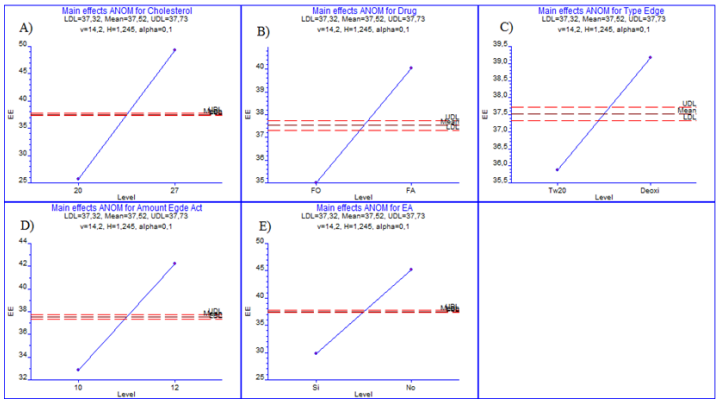


Figura 20. Gráficos ANOM, resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta de PdE antes (superior) y después (inferior) de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad de activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

A partir de los datos procedentes del estudio de ANOVA (Anexo I), puede confirmarse que todos los factores estudiados presentaron significación estadística sobre la eficacia de encapsulación. Cuando se analizó el grado de contribución de estos factores sobre la variable respuesta, se pudo observar que el factor A (colesterol) contribuyó más que el resto de factores sobre la respuesta evaluada antes de la extrusión de las vesículas; después del proceso de extrusión destaca el porcentaje de contribución de la interacción de la EA con el tipo de activador (G) y con el CH (I), como se recoge en la Figura 15.

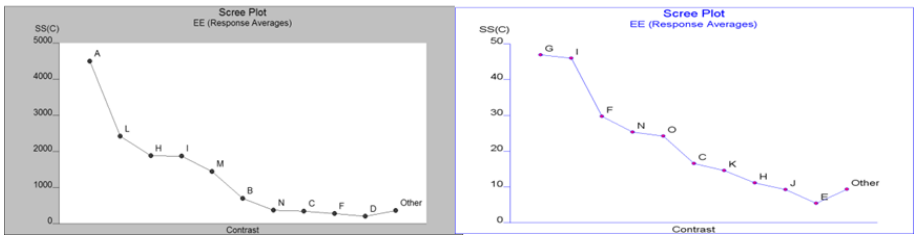


Figura 21. Contribución de los distintos factores a la respuesta PdE antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión. Se representan en ordenadas la suma de los cuadrados y en abscisas los efectos. A: F1; B: F2; C: F1xF2; D: F3; E: F1xF3; F: F2xF3; G: F4xF5; H: F4; I: F1xF4; J: F2xF4; K: F3xF5; L: F3xF4; M: F2xF5; N: F1x F5; O: F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

4.2.4. Grupos fosfatos

En lo referente a los grupos fosfatos, el ANOM realizado a los efectos principales así como el análisis de la varianza (Anexo I) indican que la incorporación del principio activo en fase acuosa u oleosa no tiene ningún efecto significativo sobre la respuesta evaluada. Por el contrario, los cuatro factores restantes sí ejercieron influencia sobre la cantidad de grupos fosfatos después de la extrusión. Estos cuatro factores tienen una influencia positiva, es decir, al pasar del nivel inferior al superior se aumenta la cantidad de grupos fosfatos (Figura 16).

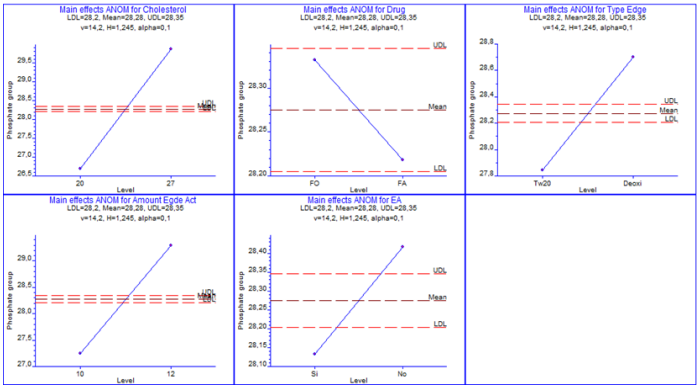


Figura 22. Gráficos ANOM, resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta grupos fosfatos después de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

El factor que contribuyó de forma más importante fue la interacción del CH con la cantidad de activador de borde incorporada, tal como se demuestra en la Figura 17.

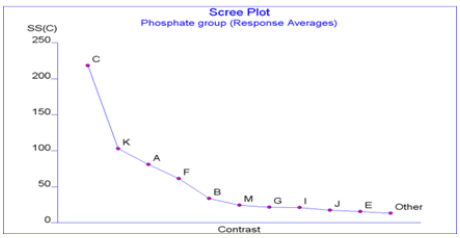


Figura 23. Contribución de los distintos factores a la respuesta grupos fosfatos después de la extrusión. Se representan en ordenadas la suma de los cuadrados y en abscisas los efectos. A: F1; B: F2; C: F1xF2; D: F3; E: F1xF3; F: F2xF3; G: F4xF5; H: F4; I: F1xF4; J: F2xF4; K: F3xF5; L: F3xF4; M: F2xF5; N: F1x F5; O: F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

4.2.5. Índice de deformabilidad (ID)

A partir de los resultados obtenidos para este parámetro, se observó que el paso del nivel inferior al superior de CH supuso una disminución en los valores del ID (Figura 18). Estos datos están en clara concordancia con estudios previos (Corvera et al., 1992) que han demostrado que la incorporación de CH en concentraciones superiores al 30% conduce a un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas fosfolipídicas, disminuyendo asimismo su libertad de movimiento, con el consiguiente incremento en la rigidez de la membrana. Probablemente, este fenómeno se encuentre relacionado con alteraciones en las propiedades de transición de fase del fosfolípido constituyente (Coderch et al., 2000).

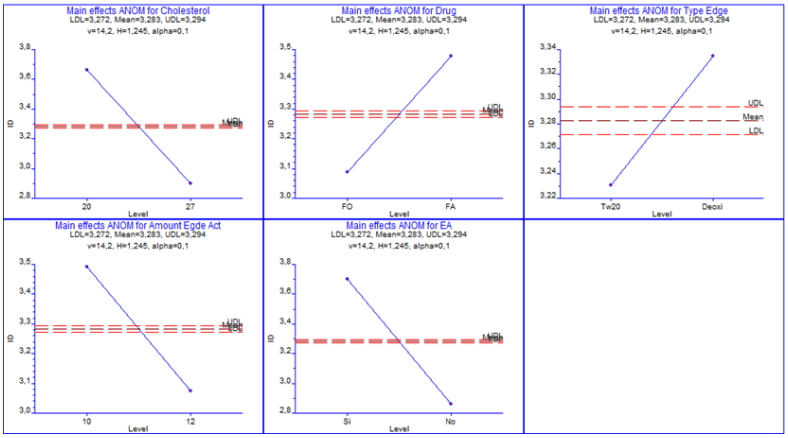


Figura 24. Gráficos ANOM, resultantes del DOE, correspondientes a la respuesta ID después de la extrusión frente al colesterol (A), incorporación del principio activo (B), tipo activador del borde (C), cantidad activador del borde (D) y estearilamina (E). Deoxi: Deo-Na.

Respecto al tipo de activador de borde, las formulaciones con Deo-Na presentaron un mayor ID. Los resultados obtenidos en este parámetro para los lotes extruidos que contenían este tensioactivo hacen pensar en el papel ejercido por Deo-Na como activador del borde en la formación de liposomas deformables. Su presencia en la composición de la bicapa permite el paso de las vesículas a través de los poros del filtro del extrusor sin que sufran rotura ni fenómenos de agregación, proporcionando una mayor ultradeformabilidad que la presentada por las formulaciones que contenían Tw20 para atravesar el filtro y después recuperar su forma. Estos datos concuerdan con estudios realizados por algunos autores y por nuestro grupo

de investigación (Maurya et al., 2010; González-Rodríguez et al., 2012). A partir de los datos procedentes del estudio ANOVA (Anexo I) puede confirmarse que todos los factores objeto de estudio del presente trabajo ejercieron un efecto estadístico significativo, presentando una mayor contribución la interacción de la EA con el tipo de activador (factor G) y con el CH (factor I), seguido de la presencia o no de EA (factor H) y de la cantidad de CH (factor A). Este efecto se visualiza igualmente en el diagrama *Scree Plot* (Figura 19).

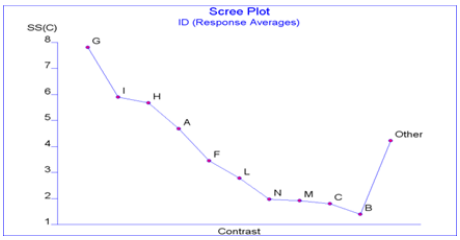


Figura 25. Contribución de los distintos factores a la respuesta ID después de la extrusión. Se representan en ordenadas la suma de los cuadrados y en abscisas los efectos. A: F1; B: F2; C: F1xF2; D: F3; E: F1xF3; F: F2xF3; G: F4xF5; H: F4; I: F1xF4; J: F2xF4; K: F3xF5; L: F3xF4; M: F2xF5; N: F1x F5; O: F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

4.3. ESTUDIO DE LA DEFORMABILIDAD

En el presente estudio, se han analizado en profundidad las propiedades de deformabilidad (ID) de los liposomas en base a dos parámetros: la recuperación de PC y el porcentaje de encapsulación, ambos después del proceso de extrusión. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Exp	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)	PdE A (%)	PdE D (%)	R PC (mg/mL)	ID (mL/min)
1	181,2 ± 3,5	0,2 ± 0,01	7,4 ± 1,2	19,1±2,4	3,0±0,05	30,1±0,2	0,33 ± 0,01
2	159,7 ± 1,3	0,1 ± 0,01	-16,0 ± 0,5	23,1±4,7	2,9±0,08	24,7±0,1	0,26 ± 0,01
3	271,5 ± 1,3	0,2 ± 0,01	2,4 ± 0,5	32,2±0,8	10,7±0,03	33,7±0,5	0,74 ± 0,01
4	177,9 ± 1,7	0,2 ± 0,03	-6,8 ± 0,4	23,7±8,4	3,0±0,02	25,7±0,09	0,32 ± 0,02
5	198,1 ± 1,0	0,3 ± 0,02	-1,4 ± 0,4	33,2±5,5	9,9±0,02	25,1±0,1	0,39 ± 0,01
6	185,8 ± 2,0	0,2 ± 0,02	-8,1 ± 0,7	21,3±1,4	3,2±0,03	31,1±0,3	0,35 ± 0,01
7	186,3 ± 1,9	0,2 ± 0,01	5,4 ± 0,3	19,1±1,5	1,6±0,01	21,5±0,4	0,35 ± 0,01
8	141,2 ± 1,8	0,1 ± 0,01	-11,7 ± 0,7	35,7±4,8	1,6±0,04	23,2±0,2	0,20 ± 0,01
9	166,6 ± 2,0	0,2 ± 0,03	-0,9 ± 0,4	29,1±7,7	1,1±0,01	24,7±0,1	0,28 ± 0,01
10	178,1 ± 2,2	0,2 ± 0,01	-6,4 ± 0,5	39,3±8,1	4,0±0,02	25,4±0,1	0,32 ± 0,01
11	172,8 ± 1,9	0,2 ± 0,02	5,6 ± 0,2	16,7±3,4	0,9±0,03	23,6±0,2	0,30 ± 0,01
12	157,9 ± 1,0	0,2 ± 0,03	-13,2 ± 0,1	82,2±9,2	5,5±0,01	31,1±0,3	0,25 ± 0,00
13	167,1 ± 1,5	0,2 ± 0,01	-13,8 ± 0,8	64,1±12,1	5,2±0,02	33,4±0,3	0,28 ± 0,01
14	163,2 ± 4,4	0,1 ± 0,01	-15,4 ± 0,9	53,6±6,2	3,1±0,02	33,5±0,2	0,27 ± 0,02
15	172,3 ± 0,7	0,2 ± 0,03	-0,9 ± 0,2	27,6±3,3	5,9±0,01	33,7±0,3	0,30 ± 0,00
16	183,7 ± 2,2	0,2 ± 0,01	-5,7 ± 0,3	86,4±4,0	5,6±0,03	33,3±0,3	0,34 ± 0,01

Tabla 12. Resultados compilados de las respuestas evaluadas después del proceso de extrusión. Los resultados correspondientes a PDE (%) antes de extruir también quedan plasmados. Exp: experimento; PdE A: antes de extrusión; PdE D: después de extrusión; R PC: recuperación fosfolípido

4.1.1. Deformabilidad y grupos fosfato

Con el fin de analizar la influencia estadísticamente significativa de los factores en las respuestas evaluadas, estos datos experimentales fueron simultáneamente explicados a partir del análisis de la varianza de los factores principales y sus interacciones para cada respuesta. Después de maximizar ambas respuestas (ID y recuperación de grupos fosfatos) y con los resultados derivados de ANOVA, las condiciones de formulación óptimas fueron las siguientes: 20 µmol de CH, 10 mg de Deo-Na, la adición de TM en la fase acuosa de las vesículas y la incorporación de EA en la bicapa, para maximizar ID. Sin embargo, para la recuperación de PC los valores fueron: 27 µmol de CH, 12 mg de Deo-Na, adición de TM en la fase acuosa de los liposomas y sin la presencia de EA en la bicapa. Esta incoherencia en los resultados puede atribuirse a la gran influencia de las interacciones entre factores en todo el sistema. Ciertamente, el grado de contribución de todos los factores (Figura 20) reveló que las interacciones de dos factores tienen un efecto en el ID y la recuperación de PC, destacando la importancia de controlar estos factores con el fin de optimizar las formulaciones en términos de conseguir vesículas lipídicas que sean altamente deformables. En este sentido, C y K (-F1/F2 y -F3/F5) tienen una gran influencia en los fosfolípidos, mientras que la interacción G (-F4/F5) puede modificar la respuesta de ID.

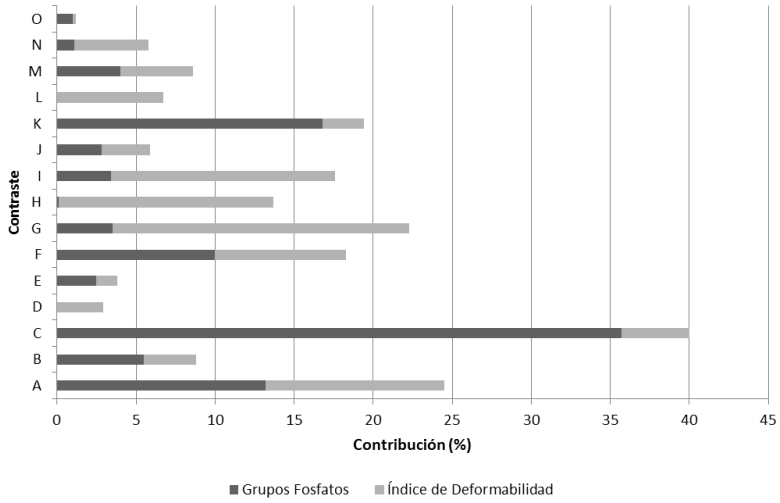


Figura 26. Porcentaje de contribución de los factores principales y sus interacciones de dos factores en los grupos de fosfato y el índice de deformabilidad (DI) después del proceso de extrusión. A: F1; B: F2; C:-F1xF2; D:F3; E:-F1xF4; F:-F2xF3; G:-F4xF5; H:F4; I:-F1xF4; J:-F2xF4; K:-F3xF5; L:-F3xF4; M:-F2xF5; N:-F1xF5; O:F5. F1: colesterol; F2: incorporación del principio activo; F3: tipo activador del borde; F4: cantidad activador del borde; F5: estearilamina.

Compilando los estudios de cribado realizados, se puede concluir que:

1. El objetivo de recuperación de vesículas (medida como concentración de PC) se mejoró utilizando los niveles más altos de CH y Deo-Na. Sin embargo, la alta contribución de la interacción entre ellos (C) puede ser responsable de las modificaciones en las predicciones del modelo. Además, la presencia de EA en la bicapa podría causar una reestructuración que genera pérdidas en la fracción de PC.

2. Con respecto al ID, estos valores fueron mayores cuando los componentes lipídicos eran más bajos, lógicamente, debido a que estas sustancias tienden a endurecer las membranas. Con respeto al tensioactivo, el nivel inferior de Deo-Na ayuda a mantener las características de deformabilidad en toda la estructura. Es importante señalar que después de analizar los efectos de estos parámetros de la formulación sobre el tamaño de las vesículas, todos presentaban la misma tendencia que respecto al ID, pudiendo así establecerse una relación entre ambos parámetros, siendo el tamaño relativo de la vesícula mayor después de la extrusión, y volviéndose más flexible y deformable la estructura liposómica después de aplicar este tratamiento.

3. La concentración de CH en la bicapa constituyó el factor que más contribuyó en los parámetros de deformabilidad (Figura 18), como factor principal que interactúa con la cantidad agregada de activador de borde. Por lo tanto, este hallazgo debe ser considerado en las próximas etapas del análisis.

A partir de los resultados obtenidos en esta etapa de cribado, claramente es necesaria una fase de optimización con el fin de clarificar la formulación adecuada que ofrezca las mejores propiedades de deformabilidad a los transfersomas.

4.1.2. Deformabilidad y porcentaje de encapsulación

El porcentaje de encapsulación de TM se ha analizado antes y después de la extrusión de las vesículas. La diferente composición lipídica de las muestras dio lugar a distintos valores de PdE, con un rango del 16 al 86% antes de su extrusión (Tabla 12). No se ha alcanzado el 100% de encapsulación en ninguna de las formulaciones ensayadas. Este resultado puede atribuirse a la composición de las vesículas, dando lugar a estructuras deformables, tal como publican algunos autores (Lasic, 1998), más permeables y facilitando, de esta manera, la salida desde los liposomas y la subsiguiente salida del fármaco encapsulado antes y durante el proceso de centrifugación. Ciertamente, el análisis ANOVA apoyó esta hipótesis y el aumento de los valores de PdE puede obtenerse internalizando el fármaco en la fase acuosa, como se comprobó. Además, el uso de Deo-Na como activador de borde en el nivel superior seleccionado (12 mg), aportó una carga negativa en la bicapa, conduciendo con frecuencia a aumentar las fuerzas de repulsión de la estructura bicapa de la vesícula, incrementando así el tamaño del compartimento acuoso interno de los liposomas y contribuyendo a mejorar la encapsulación del fármaco hidrófilo. Posteriormente, se ha encontrado una relación entre el porcentaje de fármaco perdido después del proceso de extrusión y el ID. En la Figura 21, se puede predecir la presencia de una línea de tendencia decreciente al observar la nube de puntos experimentales. Por lo tanto, el menor porcentaje de TM perdido durante el proceso de extrusión con respecto a la carga inicial corresponde al de las vesículas más flexibles.

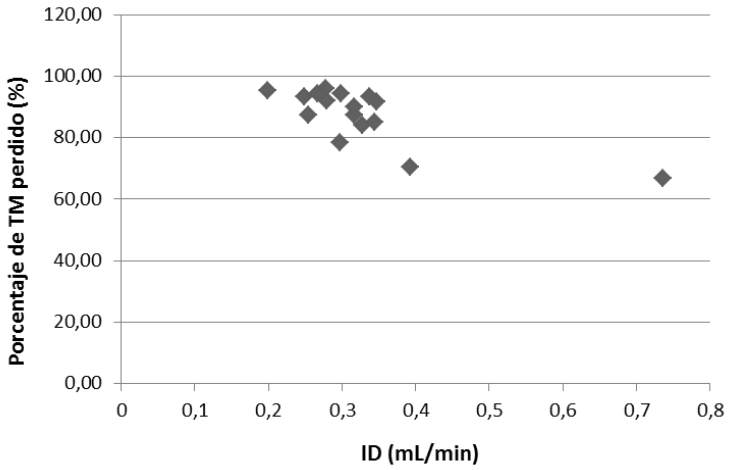


Figura 27. Relación entre el fármaco perdido en el proceso de extrusión (%) y el índice de deformabilidad (ID).

4.4. ETAPA DE OPTIMIZACIÓN

A partir de los estudios de ANOVA, se ha analizado la influencia de cinco factores de la formulación en las propiedades de deformabilidad de los transfersomas cargados con TM. Existe cierta disparidad relacionada con la influencia de algunos factores sobre las respuestas evaluadas, como las cantidades de CH y Deo-Na, y la presencia o no de un agente con carga positiva en la bicapa lipídica. Además, es predecible el efecto de las interacciones de primer orden en las respuestas. Por ello, se han aplicado tres herramientas de optimización para seleccionar la formulación adecuada dentro de nuestros propósitos: medias marginales, análisis de regresión y redes neuronales.

4.4.1. Medias marginales

La representación de las medias marginales muestra la respuesta promedio para cada nivel de cada factor en el mismo gráfico, proporcionando una visión rápida y aproximada del efecto que cada factor tiene, de forma aislada, en el proceso.

Los resultados obtenidos para el ID (mL/min) y recuperación de PC (mg/mL) se muestran en la Figura 22 (A y B), respectivamente. Este estudio se ha realizado para todas las variables analizadas (tamaño de vesícula, IP, PZ y PdE), pero sólo se han plasmado aquellos diagramas que corresponden a

parámetros de deformabilidad. No obstante, los correspondientes a las restantes respuestas quedan recogidos en el Anexo I.

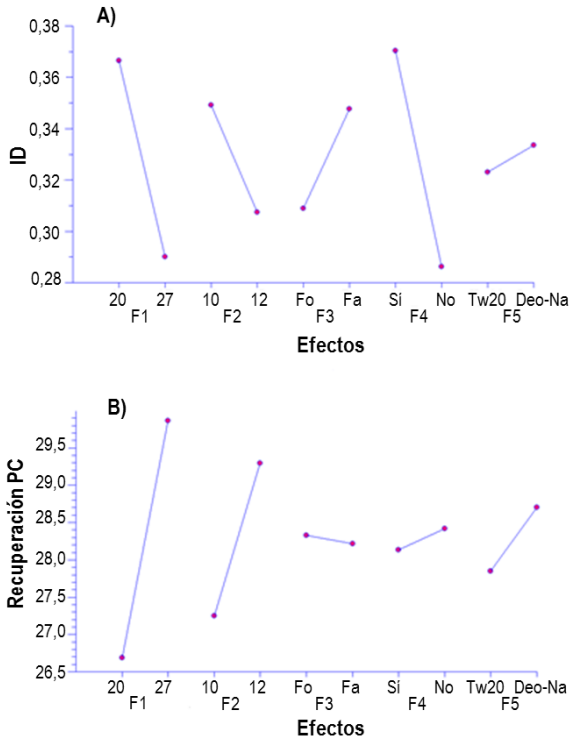


Figura 28. Diagramas de medios marginales correspondientes a (A) Índice de deformabilidad (DI) y (B) Recuperación de fosfatidilcolina.

De las figuras se deduce la combinación óptima de estos factores para maximizar ambas respuestas, obteniendo así los valores previstos para ellos. Además, este procedimiento se aplicó a las otras respuestas evaluadas, recogiéndose todos los resultados en la Tabla 13. Para cada respuesta, se realizó un experimento confirmatorio, en base al cual se calculó la predicción de error. Los valores previstos por la metodología de medias marginales se obtuvieron como el promedio de la respuesta máxima para cada nivel. En el caso del ID y recuperación de PC se detallan a continuación:

$$Máx\ ID = \frac{0{,}3656 + 0{,}3481 + 0{,}3469 + 0{,}3700 + 0{,}3344}{5} = 0{,}3530\ mL/min$$

$$Máx\ Fosfato = \frac{29{,}86 + 29{,}30 + 28{,}33 + 28{,}42 + 28{,}70}{5} = 28{,}92\ mg$$

Respuesta		Niveles optimizados F1/F2/F3/F4/F5	Valor medio predicho	Experimento confirmatorio	Error de predicción (%)
Medias Marginales	**ID**	-1/-1/1/-1/1	0,353	0,425	16,94
	R PC (%)	1/1/1/1/1	28,92	31,15	7,16
	Tamaño	-1/-1/1/-1/-1	184,84	188,0	1,68
	IP	-1/1/1/1/1	0,183	0,2	8,50
	PZ	1/1/-1/1/1	7,56	13,66	44,66
	PdE	-1/1/1/-1/1	4,60	9,87	53,39

Tabla 13. Parámetros optimizados por medias marginales. R PC: recuperación fosfolípidos.

Como se observa en esta tabla, el error de predicción para todas las respuestas varió del 1,68% al 53,39% y sólo tres de las seis respuestas tuvieron un error predicho inferior al 10 % (IP, tamaño de la vesícula y recuperación de PC) mientras que las restantes variables mostraron un error superior al 10%. Basado en estos resultados, se pudo concluir que aunque este método es fácil para aplicar, puede haber un error importante al optimizar cuando el efecto de las interacciones es considerable, como se visualizó anteriormente en los resultados de ANOVA. Por ejemplo, en el caso de la variable de PdE, para los que se obtuvo un alto error de predicción (53,39%), la contribución de los factores principales para esta respuesta fue baja, siendo el valor de contribución máxima del 10% para el tipo de activador de borde. Sin embargo, las interacciones de dos factores contribuyeron en un porcentaje más alto (> 20%). Esto puede explicar la alta variabilidad en la predicción de esta variable.

Como conclusión, el uso de otra técnica complementaria puede ser apropiado para clarificar el grado de contribución de las interacciones, en el caso de predecir las interacciones.

4.4.2. Análisis de regresión

La utilización de esta metodología de optimización permitió analizar la influencia de los factores principales y sus interacciones en la respuesta evaluada. A partir de las ecuaciones de regresión y de los parámetros del modelo ajustado (Tabla 14), se obtuvieron los parámetros optimizados y las respuestas predichas, cuyos datos se muestran en la Tabla 15.

Ecuaciones	MSE	R^2_{adj}
$\mathbf{ID = 0,328 - 0,0381CH - 0,0206AEA + 0,0194Dr - 0,0425EA + 0,00687TE + 0,0238CH \cdot AEA - 0,0137Ch \cdot Dr - 0,0325AEA \cdot Dr + 0,0431Ch \cdot EA + 0,0206AEA \cdot EA - 0,0294Dr \cdot EA - 0,025CH \cdot TE - 0,0238AEA \cdot TE + 0,0188Dr \cdot TE - 0,049AEA \cdot TE}$	0,0004	0,9981
$\boldsymbol{P = 28,3 + 1,59Ch + 1,02AEA - 0,0571Dr + 0,143EA + 0,428TE + 2,61Ch \cdot AEA + 0,696Ch \cdot Dr - 1,38AEA \cdot Dr + 0,811Ch \cdot EA + 0,735AEA \cdot EA + 0,449Ch \cdot TE - 0,871AEA \cdot TE + 1,79Dr \cdot TE - 0,82EA \cdot TE}$	0,548	0,9916
$\boldsymbol{\widehat{VS}_{log} = 2,25 - 0,0179\,F1 - 0,00826\,F2 + 0,00655\,F3 - 0,0237\,F4 - 0,00438\,F5 + 0,0117\,F1 \cdot F2 - 0,00301\,F1 \cdot F3 - 0,0167\,F2 \cdot F3 + 0,0246\,F3 \cdot F4 + 0,00735\,F2 \cdot F4 - 0,0157\,F3 \cdot F4 - 0,00889\,F1 \cdot F5 - 0,0119\,F2 \cdot F5 + 0,0039\,F3 \cdot F5 - 0,0294\,F4 \cdot F5}$ $\boldsymbol{\widehat{VS} = 10^{\widehat{VS}_{log}}}$	2,784E-5	0,9921
$\boldsymbol{\widehat{PDI} = 0,189 - 0,00552\,F1 - 0,0039\,F2 - 0,00102\,F3 - 0,0214\,F4 + 0,00281\,F5 + 0,0111\,F1 \cdot F3 - 0,0094\,F2 \cdot F3 + 0,0094\,F1 \cdot F4 + 0,00598\,F1 \cdot F5 - 0,0223\,F4 \cdot F5}$	0,003	0,7968
$\boldsymbol{\widehat{ZP} = 7,38 + 0,332\,F1 + 2,12\,F2 - 0,943\,F3 + 0,33\,F4 - 5,65\,F5 + 3,97\,F1 \cdot F2 - 1,15\,F1 \cdot F3 - 3,09\,F2 \cdot F3 - 1,58\,F1 \cdot F4 - 1,66\,F2 \cdot F4 - 1,23\,F1 \cdot F4 - 2,48\,F2 \cdot F4 + 1,7\,F3 \cdot F5 + 13,9\,F4 \cdot F5}$	0,3896	0,9844
$\boldsymbol{\widehat{PDE} = 4,21 - 0,279F1 + 0,311\,F2 + 0,152\,F3 - 0,595\,F4 + 0,878\,F5 + 0,726\,F1 \cdot F2 + 0,417\,F1 \cdot F3 - 0,973\,F2 \cdot F3 + 1,21\,F1 \cdot F4 - 0,543\,F2 \cdot F4 + 0,169\,F3 \cdot F4 - 0,898\,F1 \cdot F5 - 0,269\,F2 \cdot F5 + 0,682\,F3 \cdot F5 - 1,22\,F4 \cdot F5}$	0,001	0,999

Tabla 14. Ecuaciones de regresión y parámetros de ajuste para las variables dependientes evaluadas. F1: Cantidad de colesterol (µmol). F2: Cantidad de activador de borde (mg). F3: Fase en la que se agregó TM. F4: Adición de estearilamina. F5: Tipo de activador de borde.

Respuesta		Niveles optimizados F1/F2/F3/F4/F5	Valor medio predicho	Experimento confirmatorio	Predicción de error (%)
Análisis de Regresión	ID	-1/-1/1/-1/1	0,735	0,740	0,0676
	R PC (%)	1/1/-1/1/-1	38,534	35,13	9,7
	Tamaño	-1/1/1/1/1	141,15	141,2	0,03
	IP	-1/1/1/1/1	0,113	0,1	1,30
	PZ	-1/-1/-1/1/1	16,75	15,8	5,95
	PdE	-1/-1/1/-1/1	10,653	10,7	0,047

Tabla 15. Parámetros optimizados por análisis de regresión. R PC: recuperación de fosfolípidos.

Del mismo modo, se realizó un experimento confirmatorio para cada respuesta, sobre la base del cual se calculó el error de predicción. En contraste con el modelo anterior, en este caso se observaron valores bajos de errores de predicción, que se estimaron en base al valor R^2_{adj}, dentro del rango 0,03-9,70%. Los mayores errores se obtuvieron a partir de las respuestas PZ, IP y recuperación de PC en la que los errores de predicción en algún caso fueron tan altos como los obtenidos con el método de medias marginales. La complejidad de las interacciones, que son más sensibles para considerarse en la metodología de regresión, podría contribuir a la obtención de una variabilidad reducida. Así, el análisis de regresión proporciona una técnica de optimización adecuada con menor error de predicción.

Los resultados del ANOVA (Tabla 16) mostraron que cuando se compararon los coeficientes de las cinco variables independientes con la regresión múltiple (González-Rodríguez et al., 2016), se logró un ajuste de calidad del modelo, que fue verificado por el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}). Los valores obtenidos oscilaron entre 0,79 y 0,999, siendo los valores inferiores los de la respuesta IP, antes y después de la extrusión de los liposomas. La mayor calidad de ajuste correspondía a la respuesta de PdE, lo que indica una alta significación del modelo y una excelente correlación entre las variables independientes.

	Tamaño antes		Tamaño después		IP antes		IP después		ZP antes		ZP después		PDE antes		PDE después	
Source	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value
F1	197,2	<0,001	553,5	<0,001	63,49	<0,001	4,132	0,05	1,461	0,236	229,3	<0,001	2,793E +16	<0,001	1,041E +15	<0,001
F2	53,4	<0,001	117,5	<0,001	9,952	0,003	2,058	0,161	9,693	0,004	267,7	<0,001	4,333E +15	<0,001	1,292E +15	<0,001
F3	43,63	<0,001	73,96	<0,001	64,58	<0,001	0,1413	0,709	6,952	0,013	415,9	<0,001	1,26E +15	<0,001	3,098E +14	<0,001
F4	613,3	<0,001	969,9	<0,001	1,061	0,311	62,3	<0,001	259,6	<0,001	3563	<0,001	1,17E +16	<0,001	4,719E +15	<0,001
F5	229,4	<0,001	33,1	<0,001	0,992	0,327	1,072	0,308	126	<0,001	556,1	<0,001	5,468E +14	<0,001	1,03E +16	<0,001
-F1 x F2	367,3	<0,001	235,8	<0,001	1,449	0,237	0,0565	0,814	21,65	<0,001	155,4	<0,001	2,147E +15	<0,001	7,035E +15	<0,001
-F1 x F3	3,286	0,079	15,62	<0,001	13,23	<0,001	16,59	<0,001	9,299	0,005	103,3	<0,001	1,19E +14	<0,001	2,325E +15	<0,001
-F2 x F3	2,72	0,109	481,4	<0,001	1,471	0,234	11,97	0,002	31,54	<0,001	226,4	<0,001	1,723E +15	<0,001	1,264E +16	<0,001
-F4 x F5	483,3	<0,001	1487	<0,001	59,86	<0,001	67,24	<0,001	10,97	0,002	266,6	<0,001	3,292E +14	<0,001	1,998E +16	<0,001
-F1 x F4	0,2018	0,656	1043	<0,001	0,0491	0,826	11,97	0,002	18,24	<0,001	309,4	<0,001	1,165E +16	<0,001	1,956E +16	<0,001
-F2 x F4	0,2502	0,62	93,07	<0,001	5,536	0,025	0,2966	0,59	3,847	0,059	333,7	<0,001	2,555E +14	<0,001	3,935E +15	<0,001
-F3 x F5	361,2	<0,001	26,28	<0,001	10,82	0,002	1,563	0,22	11,9	0,002	38,81	<0,001	1,0 E +15	<0,001	6,217E +15	<0,001
-F3 x F5	247,6	<0,001	425,8	<0,001	40,18	<0,001	0,153	0,698	17,69	<0,001	74,74	<0,001	1,504E +16	<0,001	3,824E +14	<0,001
-F2 x F5	6,929	0,013	245,7	<0,001	0,02205	0,883	0,2486	0,621	15,08	<0,001	191,1	<0,001	8,969E +15	<0,001	9,69E +14	<0,001
-F1 x F5	52,58	<0,001	136,4	<0,001	48,16	<0,001	4,847	0,035	15,57	<0,001	99,09	<0,001	2,313E +15	<0,001	1,076E +16	<0,001

Tabla 16. Resultados de ANOVA para factores de formulación. IP: índice de polidispersión. PZ: potencial zeta. PdE: porcentaje de encapsulación

4.4.3. Redes Neuronales

4.4.3.1. Entrenamiento del modelo de RNA y criterios de rendimiento

Existen diferentes algoritmos implementados para el entrenamiento de la RNA. En el presente estudio, los ensayos se llevaron a cabo con diferentes números de neuronas en la capa oculta y diferentes porcentajes de entrenamiento/patrones de validación. Como se recomienda, utilizamos parcialmente los datos disponibles para entrenar la red y mantener los datos restantes para validarla. Por lo general, el 60-70% de los datos se utilizan en la fase de aprendizaje y 30-40% en la fase de validación. Ambos grupos de datos deben ser muestras representativas de toda la población. Sólo en ese caso, la red aprenderá adecuadamente para la validación posterior. El no disponer de una muestra suficientemente grande conducirá a pequeños errores con los patrones de entrenamiento que aumentan en presencia de patrones desconocidos, dando lugar a importantes inconsistencias del modelo. Por lo tanto, no es posible evaluar si el error calculado con un número tan pequeño de patrones es de la misma magnitud que cuando se utilizan patrones desconocidos. Una vez terminado el proceso de aprendizaje, la RNA será capaz de inferir correctamente la salida de patrones de entrada desconocidos.

Con el fin de entrenar la red, se realizaron varios ensayos con diferentes números de neuronas en la capa oculta (Krajišnik et al., 2014). La red ha sido entrenada utilizando de 5 a 14 neuronas en la capa oculta. El número óptimo de ciclos de entrenamiento (iteraciones) se identificó mediante el entrenamiento de una RNA con una sola capa oculta y el seguimiento del error de aprendizaje y error de validación. En la Figura 23 quedan representados los datos de la Tabla 17, la cual muestra esta información y las iteraciones variando el porcentaje de patrones. El eje horizontal representa el número de neuronas en la capa oculta. El eje vertical izquierdo representa errores de aprendizaje y de validación. El eje vertical derecho representa el número de iteraciones. La alteración del número de neuronas ocultas y diferentes porcentajes de los patrones de entrenamiento/validación dio un total de 300 configuraciones diferentes de la red. A partir de los datos promediados para las 10 series y la figura, podemos observar que el error de validación (línea roja) disminuye a medida que el número de neuronas aumenta, hasta un cierto valor, en el cual se convierte en asintótico.

La etapa de entrenamiento se inicia asignando aleatoriamente el peso a la capa oculta, y los vectores de entrada y salida se presentan a la RNA. A medida que avanza el entrenamiento, los pesos de la red convergen gradualmente en valores tales que cada vector de entrada produce el vector de salida deseado. Por último, la RNA se optimizó con respecto al número de nodos en la capa oculta para proporcionar un buen rendimiento predictivo. Para cada diseño de arquitectura, la capacidad predictiva se evaluó mediante la comparación del número de neuronas ocultas que se tradujo en menores errores de aprendizaje y de validación. A partir de las figuras, podemos apreciar que el aumento en el número de neuronas requiere un proceso de aprendizaje con menor número de iteraciones implícitas (véase la línea amarilla). Por lo tanto, debe evitarse un número innecesario de neuronas, ya que pueden sobreentrenar la red, dando lugar a errores en la fase de inferencia.

N Neuronas ocultas	Iteraciones	Error de aprendizaje	Error de validación
5	10000	0.0725975	0.0956266
6	10000	0.0650939	0.093251
7	10000	0.0530597	0.0788378
8	10000	0.048943	0.0769575
9	10000	0.0449553	0.0715593
10	10000	0.0434548	0.0704067
11	10000	0.0419971	0.0700615
12	10000	0.0414444	0.0695542
13	9661.8	0.0414242	0.0696559
14	9745.4	0.0414188	0.0696192

(A)

N Neuronas ocultas	Iteraciones	Error de aprendizaje	Error de validación
5	10000	0.0790811	0.0949924
6	10000	0.0664821	0.0796103
7	10000	0.0577492	0.0703536
8	10000	0.0527295	0.0669625
9	10000	0.0487787	0.0636931
10	10000	0.046868	0.0630337
11	10000	0.0458152	0.061582
12	10000	0.0456552	0.0609771
13	9690.4	0.0456547	0.061012
14	9025	0.0456194	0.0610673

(B)

N Neuronas ocultas	Iteraciones	Error de aprendizaje	Error de validación
5	10000	0.0771854	0.0992181
6	10000	0.0647881	0.0863888
7	10000	0.0579901	0.0808795
8	10000	0.0516915	0.0798113
9	10000	0.0481795	0.0727789
10	10000	0.0461788	0.0733208
11	10000	0.0452309	0.0733571
12	10000	0.0451918	0.0735154
13	9339	0.0447212	0.0737072
14	8337.9	0.0447175	0.0734428

(C)

Tabla 17. Resultados del entrenamiento de la RNA. A) Resultados del entrenamiento con el 70% de los patrones disponibles (34-aprendizaje, 14-validación); B) Resultados del entrenamiento con el 80% de los patrones disponibles (38-aprendizaje, 10-

validación); C) Resultados del entrenamiento con el 90% de los patrones disponibles (43-aprendizaje, 5-validación).

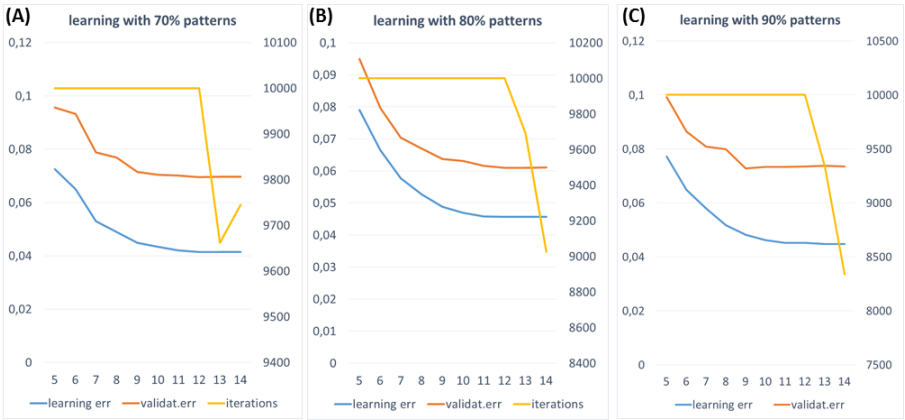


Figura 29. Proceso de formación de la RNA. A) Con el 70% de patrones. B) Con 80% de patrones. C) Con el 90% de patrones.

Como conclusión a esta etapa de entrenamiento, los mejores resultados en términos de error de validación se han obtenido cuando el número de neuronas ocultas fue de 12 y la fase de entrenamiento utilizó el 80% de los patrones disponibles. Por lo tanto, la red diseñada fue una red MPN *feed-forward*, consistente en una capa oculta con doce neuronas, con cinco entradas y ocho salidas (a menudo se indica como una red 5: 12: 8), como se muestra en la Figura 24.

La capacidad predictiva de la RNA desarrollada mediante el uso de esta arquitectura de doce nodos nos permitió comparar los efectos de los diseños experimentales (Nemati et al., 2013). En este estudio, la predicción de los parámetros dimensionales, la carga superficial y la eficacia de encapsulación de fármacos basadas en las variables de formulación de entrada, derivadas de un modelo matemático, pretenden reducir el proceso de desarrollo de la formulación. Por lo tanto, podemos concluir que esta herramienta funciona adecuadamente para nuestro propósito en la predicción del patrón de comportamiento o parámetros de formulación de liposomas deformables.

Se ha obtenido un buen rendimiento predictivo después de optimizar la red con respecto al número de neuronas en la capa oculta. Los componentes del vector de entrada fueron la cantidad de CH, el tipo y cantidad de activador de borde, la presencia de EA y la fase de incorporación del fármaco en el liposoma. Los componentes del vector de salida fueron algunos parámetros

fisicoquímicos (tamaño, IP, PZ) y PdE. Por lo tanto, las predicciones se utilizaron como conjuntos de datos de entrada para obtener todas las respuestas.

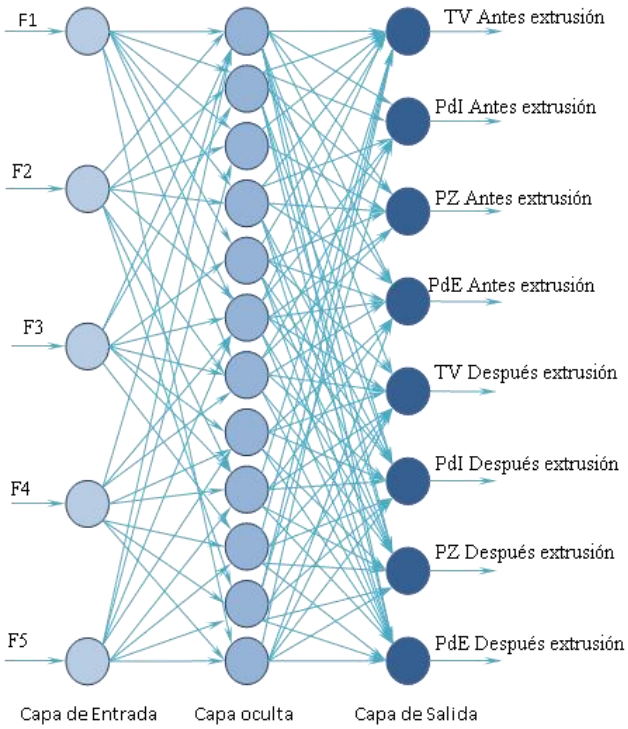


Figura 30. RNA arquitectura óptima utilizada en la experimentación.

Para probar el rendimiento de la RNA, los datos correspondientes a las variables de salida se introdujeron en la RNA diseñada y se obtuvieron los parámetros de formulación pronosticados. Los errores de predicción para la RNA deben reducirse al mínimo y utilizando esta arquitectura de 12 nodos para el entrenamiento, se desarrolló la capacidad predictiva de la RNA. Como se muestra en la Tabla 18, los resultados de los errores de predicción para los valores experimentales frente a los predichos utilizando el modelo RNA confirmaron el buen rendimiento de la RNA para predecir los parámetros de la formulación. En la Tabla 18A se recoge la relación entre la RNA predicha (calculada) y el valor observado (experimento de confirmación) para todos los datos establecidos.

Como puede observarse, se obtuvieron menores errores de predicción para PdE (0,03 y 0,047, antes y después del proceso de extrusión, respectivamente), proporcionando el mayor rendimiento predictivo global. De acuerdo con la prueba de ANOVA, el mayor error de predicción se obtuvo para el PZ, como consecuencia de la variabilidad de este parámetro en las formulaciones. Dado que el resultado de la formación ha sido satisfactoria, el modelo de RNA ha sido eficaz en el modelado de la relación entrada-salida no lineal en este sistema y fue capaz de predecir los parámetros dimensionales, carga superficial y PdE basado en la formulación del dispositivo (Díaz-Rodríguez y Landin, 2012).

(A)	Respuesta	Niveles optimizados parámetros Ch/AEA/Dr/Ea/TE	Valor medio esperado	Experimento Confirmatorio	Predicción de error (%)
Antes	VS	1/-1/-1/1/-1	511.10	531.6	0.32
	PDI	-1/1/-1/-1/-1	0	0.03	3.00
	ZP	-1/1/1/1/1	16.32	16.1	1.36
	PDE	1/1/1/1/1	86.373	86.4	0.03
Después	VS	-1/1/1/1/1	141.15	141.2	0.03
	PDI	-1/1/1/1/1	0.113	0.1	1.30
	ZP	1/1/-1/1/1	14.68	15.4	4.51
	PDE	-1/-1/1/-1/1	10.653	10.7	0.047
				Avg Error (%)	1.324

(B)	Respuesta	Niveles optimizados parámetros Ch/AEA/Dr/Ea/TE	Valor medio esperado	Experimento Confirmatorio	Predicción de error (%)	Técnica
Antes	VS	1/-1/-1/1/-1	511.10	531.6	0.32	NN
	PDI	-1/1/-1/-1/-1	0	0.03	3.00	NN/R
	ZP	-1/1/1/1/1	16.32	16.1	1.36	NN
	PDE	1/1/1/1/-1	86.373	86.4	0.03	NN/R
Después	VS	-1/1/1/1/1	141.15	141.2	0.03	NN/R
	PDI	1/1/-1/1/1	0.113	0.1	1.3	NN/R
	ZP	1/1/-1/1/1	14.68	15.4	4.51	NN
	PDE	-1/-1/1/-1/1	10.653	10.7	0.047	NN/R

Tabla 18. A) Valores pronosticados para los parámetros de formulación encontrados usando la RNA; B) Valores optimizados (RNA y MLR).

4.4.3.2. Comparación de las herramientas RNA y regresión múltiple

Son varios los modelos que están disponibles para optimizar las variables de formulación y procesamiento durante el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos, incluyendo el análisis de regresión múltiple, metodología de superficie de respuesta, algoritmos genéticos y el concepto de RNA. Asimismo, son conocidas las ventajas significativas de las RNA en

comparación con otros modelos estadísticos, que requieren diseños experimentales estrictamente estructurados, ya que éstas pueden utilizar datos históricos o incompletos para predecir las respuestas y pueden generalizar la relación entre variables independientes y dependientes sin una función matemática específica.

En este trabajo se validó la utilización del modelo RNA y se comparó con el de la regresión lineal múltiple y las medias marginales, ya publicado por González-Rodríguez et al. (2016), utilizando los datos experimentales generados a partir de la Tabla 7.

Tanto RNA como MLR generaron resultados diferentes en el valor promedio esperado de las variables de salida, como se muestra en la Tabla 18B. Para comprobar la exactitud de estas predicciones, se prepararon las formulaciones de liposomas optimizadas. Los resultados experimentales fueron comparables a los resultados previstos en el caso de PdE (error de predicción < 0,05). Además, el IP se predijo igualmente utilizando herramientas MLR o RNA. Sin embargo, el "tamaño" de salida antes de la extrusión mostró diferencias en la capacidad de predicción cuando se aplicó MLR, obteniendo mejores resultados con RNA. Se obtuvieron resultados similares para los valores de PZ.

Estas observaciones indicaron que la RNA, entrenada con el protocolo descrito, mostró una mejor capacidad predictiva y precisión que el modelo MLR, con menor error de predicción en muchos casos. Como se observa en la Tabla 18, el error de predicción fue inferior al 3% en siete casos y del 4,51% sólo en uno de ellos. También se observa que el error promedio disminuye 0,5 puntos en comparación con los resultados anteriores, lo que implica una reducción del 28,8%. Estos hallazgos están de acuerdo con Arulsudar et al. (2005), que demostraron que el modelo de RNA proporcionaba una predicción más precisa de las variables de formulación sobre la respuesta de PdE de los liposomas que encapsulaban leuprolide, y fue bastante útil en la optimización de formulaciones farmacéuticas cuando se comparó con el método de análisis de regresión múltiple.

Por tanto, la formulación optimizada de TM estaba compuesta por TM 0,5 mg/mL, PC 68 µmol, CH 20 µmol, Deo-Na 23,2 mmol, EA 18,56 mmol, siendo añadido el fármaco en el compartimento acuoso de los liposomas.

4.5. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN *IN VITRO*

El objetivo de este estudio fue demostrar que una formulación optimizada de liposomas deformables mostraba un comportamiento de permeación diferente con respecto a los liposomas convencionales y a soluciones estándar de TM.

Los perfiles de permeación *in vitro* obtenidos (Figura 25) revelaron que la influencia de la composición de la bicapa era evidente (Deo-Na). Analizando las primeras 2 h, la cantidad de fármaco permeado fue lineal en todas las formulaciones, atribuible a un efecto del fármaco libre en las formulaciones. Después de este tiempo, el comportamiento fue diferente en las muestras. El porcentaje y la velocidad de permeación del fármaco que permeó desde los liposomas y la solución estándar fue similar, demostrando que la liberación del fármaco contenido en los liposomas a través de la membrana se produjo antes que la solución de TM (Jss: 0,2361 ± 0,0489 y 0,2822 ± 0,0501 $\mu g \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$, respectivamente). Sin embargo, la composición de la bicapa de los transfersomas permite la liberación sostenida de TM como consecuencia de la liberación del fármaco una vez que la vesícula ha pasado a través de la membrana (Jss: 0,1477 $\mu g \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$). De esta forma, se demostró que la relación de tensioactivos y lípidos y el tipo de tensioactivo son el principal factor clave para determinar la flexibilidad de la bicapa de los transfersomas.

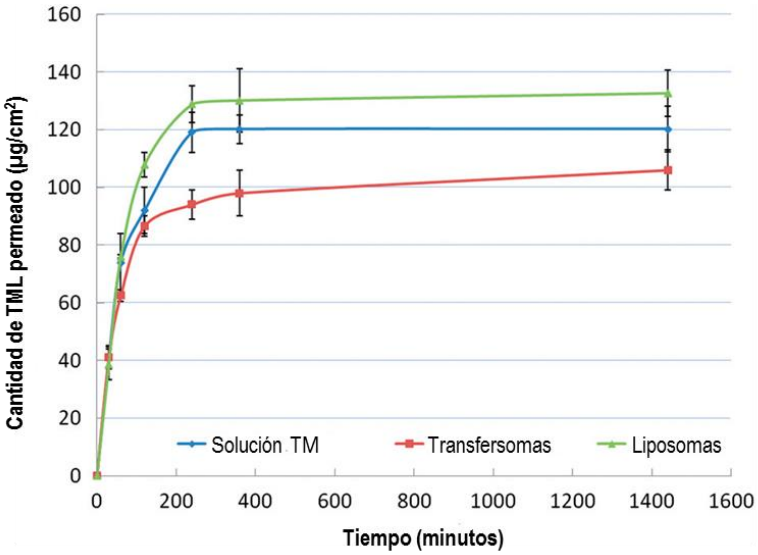


Figura 31. Perfiles del ensayo de permeación de TM *in vitro*. Se representa la cantidad de TM permeado vs tiempo.

4.6. FORMULACIONES OPTIMIZADAS

Una vez analizada la influencia de las distintas variables de la composición sobre las características de las vesículas, y habiendo realizado la optimización de las respuestas, se elaboraron las formulaciones óptimas para efectuar los estudios *in vitro* y su posterior caracterización, así como los estudios *in vivo*. Dado que el objetivo final de esta tesis está orientado a la incorporación de un segundo principio activo antiglaucomatoso para aprovechar el efecto sinérgico, es por ello, que en las vesículas DL2 se incorporó el TM en la fase oleosa atendiendo a los resultados positivos de esta ubicación del fármaco cuando se co-administró con otro fármaco, cuyo análisis se desarrollará en el Capítulo II. La composición DL1 responde también a una optimización que se desglosará en el siguiente capítulo aunque mantiene el TM en la fase acuosa tal y como se ha visto hasta ahora en las optimizaciones de este Capítulo. Por el contrario, los liposomas convencionales (CL), sin activador de borde, mantienen una composición similar a la formulación óptima pero con el nivel superior de CH, ya que en este tipo de vesículas, el ID no adquiere especial relevancia pero sí es crucial mantener un menor tamaño vesicular, y un mayor PdE y recuperación de PC, y para ello, como se ha visto en las optimizaciones individuales, fijar el nivel superior de colesterol resulta más adecuado en términos de estabilidad. La composición de las distintas formulaciones queda recogida en la Tabla 4 (apartado 3.3. Preparación de liposomas deformables).

4.6.1. Caracterización de las vesículas

Se utilizó acetato de uranilo como tinción negativa para estas muestras. La reacción con las vesículas se produjo adecuadamente permitiendo la visualización y diferenciación de la membrana vesicular. Las microfotografías por TEM (Figura 26) revelaron que DL1 y DL2 exhiben forma esférica irregular debido a la mayor fluidez de la bicapa lipídica, que se alteró en comparación con otras vesículas que eran de forma esférica (CL). Esto ocurre como un efecto de la alta deformabilidad de las membranas vesiculares que les permite adaptar su forma al espacio circundante.

Los resultados de los parámetros utilizados para caracterizar todas las formulaciones se muestran en la Tabla 19. En la optimización de las formulaciones de vesículas para administración oftálmica, estas propiedades

fisicoquímicas se convierten en parámetros esenciales, para proporcionar un mejor flujo de los fármacos a través de la membrana corneal.

En relación con el tamaño de las vesículas, se han evaluado dos factores relevantes. En primer lugar, la diferencia en los lípidos totales (principalmente CH) en estas formulaciones ha demostrado que mientras que la formulación CL contenía 99,7 µmol (27 µmol de CH), las formulaciones DL1 y DL2 se prepararon con 183,89 (81,2 µmol de CH) y 188,59 (81,2 µmol de CH), respectivamente. Esta composición da lugar a vesículas más pequeñas en el caso de CL antes de la extrusión en comparación con los liposomas deformables (datos no mostrados).

Grupo	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)	Coeficiente de partición	ID ($\mu L \cdot s \cdot cm^{-2}$)	PdE (%)
CL	151,0±1,33	0,459±0,02	-2,95±0,27	4,22±0,958	0,936±0,020	17,652±2,574
DL1	247,6±4,73	0,199±0,01	-2,03±0,79	3,21±0,741	2,296±0,060	14,806±5,471
DL2	354,9±5,41	0,243±0,19	-2,66±0,29	3,19±0,087	7,871±0,258	26,690±5,231

Tabla 19. Propiedades fisicoquímicas de las vesículas lipídicas preparadas.

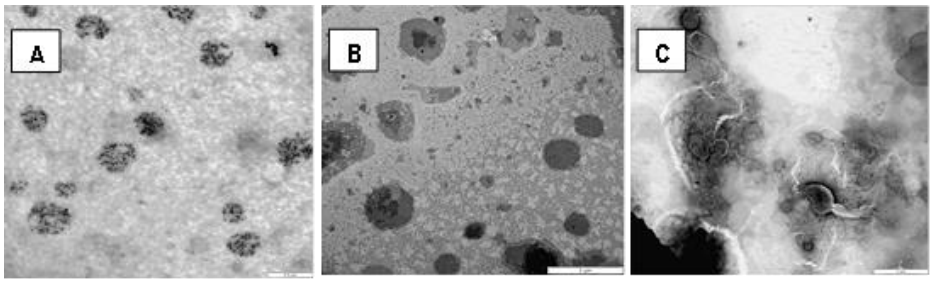


Figura 32. Imágenes por TEM de vesículas cargadas de TM. A) Liposomas convencionales (CL). B) Liposomas deformables (DL1). C) Liposomas deformables con etanol (DL2).

Por otra parte, la presencia del activador de borde en la bicapa lipídica contribuyó a la recuperación de vesículas después del proceso de extrusión con mayor diámetro y menor IP que CL. Estos resultados están en concordancia con los expuestos por Duangjit et al. (2014), donde se concluía que la incorporación del activador de borde puede alcanzar una curvatura más alta dando lugar a una deformación de liposomas con mayor tamaño de vesícula respecto a liposomas convencionales, a pesar de poner 10-15% de

CH. Así, el tamaño de las vesículas se ha incrementado debido al aumento de la fuerza de repulsión neta y la reducción de las fuerzas de atracción de van der Waals entre las bicapas de estos sistemas (Liang et al., 2004). La obtención de tamaños de vesículas superiores a 250 nm en el caso de DL2 puede ser atribuido al efecto combinado del activador de borde y el etanol sobre las propiedades de deformabilidad de los liposomas. Con respecto al IP, la formulación de CL mostró valores superiores a 0,2 (población heterogénea). En comparación con DL1 (IP = 0,199) y DL2 (IP = 0,243), el efecto del activador de borde en la obtención de vesículas más homogéneas era evidente, principalmente mediante la adición del fármaco al compartimiento acuoso, como DL1.

Finalmente, la carga superficial no se modificó significativamente cuando la bicapa lipídica fue diferente. Los valores bajos ligeramente negativos pueden explicarse como consecuencia de la neutralización de todos los compuestos cargados, tales como PC y Deo-Na (sustancias de carga negativa) con el fármaco (compuesto cargado positivamente), (Shihui et al., 2015). En cuanto al parámetro PdE, los valores más altos se obtuvieron en las formulaciones DL2: el tamaño de la vesícula y la estructura unilaminar de los liposomas extruidos contribuyó al mantenimiento de TM atrapado en el compartimiento acuoso.

4.6.2. Elasticidad de las vesículas

La elasticidad es un parámetro clave para favorecer la penetración de las vesículas lipídicas a través de la barrera ocular; por lo tanto, es crítico que el sistema *nanocarrier* debe ser deformable para poder pasar íntegro fácilmente a través de los poros corneales (Gupta et al., 2005; Song et al., 2012). Las formulaciones se sometieron al estudio de deformabilidad siguiendo el método de la extrusión. Los valores obtenidos se expresaron en términos de índice de elasticidad utilizando la ecuación mostrada en la sección experimental (Tabla 20). Como es lógico, CL mostró la menor elasticidad (0,936 $\mu L \cdot s \cdot cm^{-2}$) en comparación con las vesículas flexibles. Los valores más altos de elasticidad fueron para DL2, de acuerdo con otros autores (Song et al., 2012).

Aunque el CH aumenta la densidad de empaquetamiento y la rigidez de la estructura, reduciendo la elasticidad de las bicapas vesiculares (Elsayed et al., 2007; Gracià et al., 2010), la incorporación del activador de borde Deo-Na

tiene un efecto positivo en las propiedades de deformabilidad porque un radio de curvatura más alto hace aumentar este parámetro. Además, la presencia de etanol en la muestra perturba significativamente la bicapa lipídica, proporcionando maleabilidad y flexibilidad, que permiten a los liposomas pasar más fácilmente a través del filtro de extrusión (Ghanbarzadeh y Arami, 2013).

4.6.3. Coeficiente de reparto

El coeficiente de reparto (PC_D) es la relación que existe entre las concentraciones de fármaco en la fase lipídica y la fase acuosa continua. Se estimó un valor de PC_D de 4,22 ± 0,958 para liposomas convencionales, en los que TM se incorporó en la fase acuosa. Este valor fue significativamente mayor que el observado con DL1 (3,21 ± 0,741) y DL2 (3,19 ± 0,087), donde existe una mayor cantidad total de lípidos. Este resultado predice el comportamiento de TM con respecto a la afinidad del fármaco con el lípido de la bicapa y la influencia de la relación de lípidos y fase acuosa sobre este valor de partición.

4.6.4. Estudio de estabilidad

El estudio de estabilidad de las formulaciones liposomales preparadas se llevó a cabo durante 30 días. En este tiempo, el tamaño vesicular de todas las formulaciones extruidas se mantuvo, aumentando un máximo de 25 nm en DL1, y el PZ cambió en el intervalo de aproximadamente unos 5 mV durante el período de almacenamiento. Estos resultados están de acuerdo con el incremento de tamaño de unos 20 nm presentado por otros autores (Meissner et al., 2015). TM se mantuvo estable en todas las formulaciones liposomales preparadas cuando se analizaron en términos de tamaño de vesícula, IP, PZ y PdE del fármaco en liposomas a 4 °C (Tabla 20).

Días				
	CLs			
	Tamaño (nm)	**IP**	**Potencial Zeta (mV)**	**PdE (%)**
0	151,0±1,33	0,459±0,02	-2,95±0,27	17,65±2,57
7	152,0±2,11	0,489±0,01	-2,95±0,14	14,81±3,12
14	150,8±2,58	0,550±0,02	-3.05±0,13	15,20±2,58
21	155,5±1,95	0,702±0,03	-3,29±0,10	15,74±3,69
30	149,4±3,12	0,317±0,01	-6,72±0,15	19,09±1,47
	DL1			
	Tamaño (nm)	**IP**	**Potencial Zeta (mV)**	**PdE (%)**
0	247,6±4,73	0,199±0,01	-2,03±0,79	14,81±5,47
7	240,6±3,58	0,189±0,02	-2,33±0,25	17,65±3,65
14	230,6±1,47	0,184±0,03	-2,58±0,36	16,55±4,11
21	229,8±3,69	0,218±0,05	-3,84±0,41	15,47±6,54
30	222,1±2,58	0,199±0,08	-5,65±0,25	12,48±5,68
	DL2			
	Tamaño (nm)	**IP**	**Potencial Zeta (mV)**	**PdE (%)**
0	354,9±5,41	0,243±0,19	-2,66±0,29	26,69±5,23
7	355,9±6,11	0,293±0,12	-2,86±0,15	27,69±6,11
14	353,8±4,23	0,300±0,13	-3,12±0,20	27,80±5,41
21	354,6±6,87	0,363±0,11	-3,62±0,23	30,46±6,23
30	356,9±5,12	0,197±0,08	-8,53±0,25	29,50±7,11

Tabla 20. Estudio de estabilidad realizado durante un mes a 4 °C. Media ± DE.

4.6.5. Estudios de liberación *in vitro*

Este ensayo se realizó en un medio similar a las lágrimas artificiales, a 37 °C. Como se muestra en la Figura 27, la cinética de liberación de TM fue idéntica en todas las formulaciones: inicialmente se observó un proceso de liberación rápido, correspondiente a la fracción libre de fármaco en el medio de disolución. Casi el 90% del TM fue liberado en 2 h. La rápida liberación del fármaco se atribuyó a la difusión del fármaco libre desde el núcleo de los liposomas y, a pesar de la composición diferente, las vesículas lipídicas no son el factor de control para la liberación del fármaco, sino la solubilidad del TM.

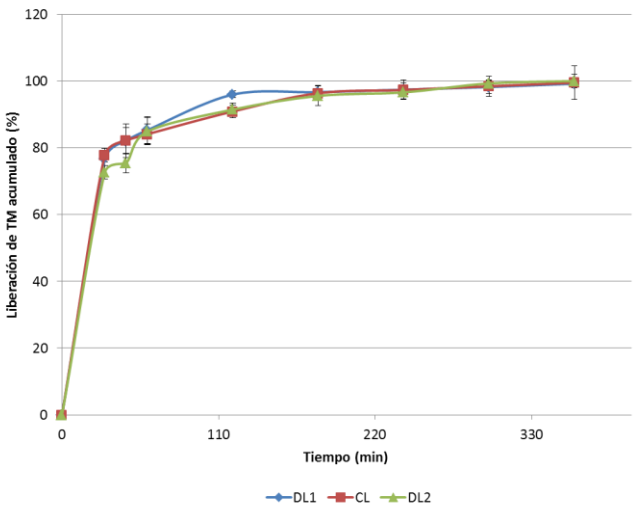


Figura 33. Perfiles de liberación **in vitro** de TM a partir de liposomas deformables (DL1 y DL2) y liposomas convencionales (CL).

4.6.6. Estudios de permeación *in vitro*

Se realizaron estudios de permeación *in vitro* para evaluar la influencia de la composición y la disposición del fármaco en las vesículas sobre la penetración del fármaco. Se colocaron cantidades iguales de las diferentes formulaciones, incluyendo la solución, CL, DL1 y DL2 en la superficie de la membrana artificial en el compartimiento donador para evaluar su capacidad de penetración a través de la membrana. La cantidad de TM permeada durante 24 h se representó en función del tiempo.

La Tabla 21 presenta los parámetros de permeación del TM a través de la membrana así como la cantidad de principio activo retenido y permeado durante 24 h a partir de las diferentes formulaciones.

Como puede observarse, la cantidad acumulada de fármaco que permeó desde las formulaciones después de 24 h no fue significativamente diferente a la del fármaco permeado en la solución acuosa ($p < 0,05$). Sin embargo, el flujo medio (J) osciló entre 0,3036 ± 0,008 y 1,6467 ± 0,052 $\mu g/cm^2 \cdot min$ para DL y solución control, respectivamente; y el coeficiente de permeabilidad (K_p) se mantuvo entre 0,364 ± 0,009 y 1,976 ± 0,001 mm/h para DL y la solución de control, respectivamente. Los resultados del flujo y el coeficiente de permeabilidad de la solución de TM y CL fueron 5 y 4 veces superiores a DL2, respectivamente. Los resultados también revelaron que, en comparación con

CL, la incorporación del activador de borde y etanol en la composición podría reducir significativamente el J y P hasta 4 veces. Se puede concluir del estudio que DL1 y DL2 podrían penetrar y depositar menos TM que CL. El elevado flujo de CL indicó que estas vesículas podrían constituir un reservorio de principio activo para prolongar el efecto del TM, de acuerdo con otros autores (Tsai et al., 2015).

Formulación	Cantidad permeada en 24 h (μg/cm^2)	J (μg/cm^2·min)	P (mm/h)
Solución control	144,78	1,647	1,976
CL	132,67	1,267	1,520
DL1	141,31	0,489	0,588
DL2	130,62	0,304	0,364

Tabla 21. Parámetros de permeación en celdas de Franz.

4.6.7. Medición de PIO

Se realizaron experimentos independientes en 10 conejos (n = 10) para evaluar el efecto hipotensor de cada formulación. Se utilizaron como muestras control dos concentraciones diferentes de soluciones de TM (0,5 mg/mL y 5 mg/mL). Se probó una sola dosis en un solo animal cada día, y al menos, se aplicó un período de lavado de 48 horas entre cada experimento. El efecto de las formulaciones de TM descritas en este estudio se comparó utilizando el efecto hipotensor máximo del fármaco (%), el área bajo la curva del ΔPIO (%) en función del tiempo (h) de 0 a 7 horas (AUC), y el tiempo medio (h) en el que la duración del efecto hipotensor se mantuvo.

Todos los vehículos que contenían TM fueron capaces de mantener el efecto hipotensor de TM, proporcionando diferentes efectos máximos y un porcentaje máximo de reducción de la PIO, que se muestra en la Tabla 22 y en la Figura 28. Actualmente, la concentración de TM usada comercialmente es de 5 mg/mL, pero en los estudios *in vivo* realizados en los conejos, la eficacia demostró que el efecto hipotensor de TM (0,5 mg/mL) se incrementó notablemente con la combinación de CL o DL2. Tomando la formulación de 0,5 mg/mL de TM como una solución de referencia (11,58% de reducción de PIO), se obtuvieron diferencias significativas en el efecto hipotensor máximo con DL2 (20,06%, p = 0,0072) y CL (23,02%, p = 0,0008), como se muestra en la Figura 29. Por lo tanto, la eficacia fue similar a la

concentración de 5 mg/mL de TM (24,47% de reducción de PIO) utilizando una concentración de fármaco diez veces menor.

Respecto a los valores de AUC, se obtuvo que la correspondiente a la solución de TM 0,5 mg/mL fue significativamente menor que los valores de AUC obtenidos para DL2 y CL (p = 0,0072 y 0,0008, respectivamente). Con respecto al efecto de tiempo medio, la formulación de referencia de 0,5 mg/mL duró aproximadamente 4 horas. Este efecto fue superado por la formulación que contenía liposomas ultradeformables y convencionales, cuyo efecto duró aproximadamente 5 y 7 horas, respectivamente.

Formulación	Tiempo medio (h)	Reducción máxima de la PIO (%)	AUC (0-7 h) (%·h)
Solución de TM (5 mg/mL)	5	24,47±1,85	71,78±7,08
Solución de TM (0,5 mg/mL)	4	11,58±2,58	32,13±7,70
DL2	5	20,06±2,89*	63,80±12,82*
CLs	7	23,02±1,38*	86,14±7,26*

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos y farmacológicos evaluados de diferentes formulaciones. [TM]=0,5 mg/mL. *Diferencia significativa con la solución [TM]=0,5 mg/mL (P < 0,05).

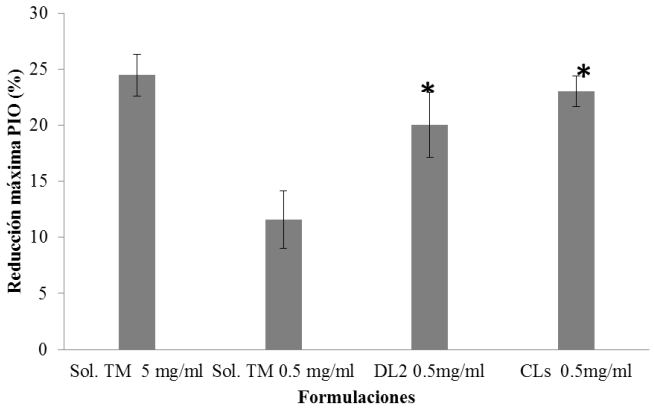


Figura 34. Efecto hipotensor máximo (% ± S.E.M) de la solución [TM] 5 mg/mL y [TM] 0,5 mg/mL y DL2 y CL con [TM] 0,5 mg/mL. * Diferencias significativas con la solución [TM] 0,5 mg/mL (P < 0,05).

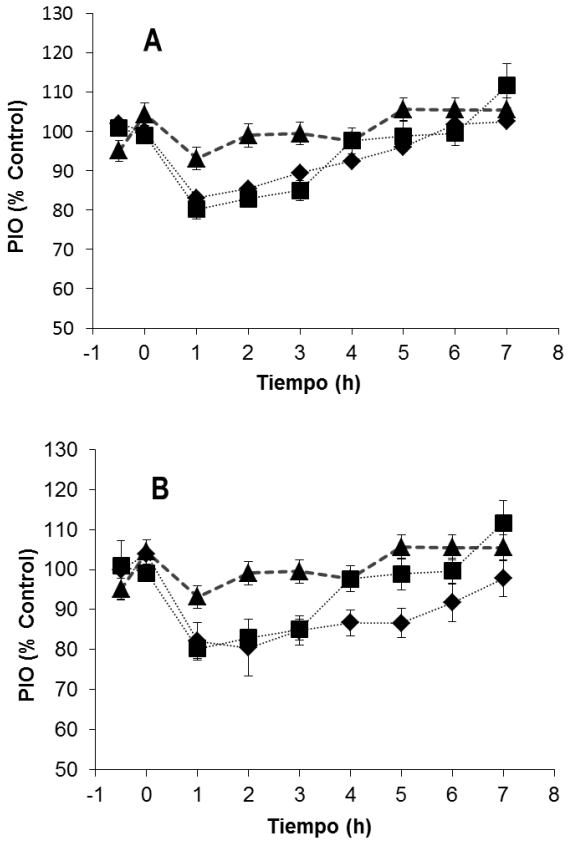


Figura 35. Perfiles de PIO de (▲) Solución [TM] 0,5 mg/mL; (■) Solución [TM] 5 mg/mL; y A) (♦) DL2 [TM] 0.5 mg/mL; B) (♦) CL [TM] 0.5 mg/mL.

4.6.8. Ensayos de irritación ocular

4.6.8.1. Método de Draize modificado

Antes de realizar el experimento, todos los conejos mostraron una superficie ocular normal con una córnea transparente. Tras la instilación, ambas formulaciones se consideraron no irritantes porque presentaron una puntuación inferior a 10. Después de la instilación, la solución de LSS produjo una irritación notable con una puntuación mayor de 60, alcanzando su pico a los 30 minutos tras la instilación, disminuyendo el efecto irritante a medida que pasaba el tiempo. En cualquiera de las formulaciones ensayadas, pueden apreciarse trastornos de la conjuntiva, incluyendo hiperemia o edema, hinchazón del párpado o parpadeo intenso. Sin embargo, los animales no

mostraron ningún malestar o irritación durante el examen. La córnea permaneció transparente (sin vasos) durante todo el ensayo y la coloración de la conjuntiva permaneció normal. No se observaron secreciones de moco en ningún animal.

4.6.8.2. Examen histológico

En la Figura 30 se exponen las secciones transversales de las córneas después de la administración de las diferentes formulaciones. En la Figura 30A se muestra que, aparentemente, no aparecieron cambios en el epitelio y el estroma cuando se administró la solución de NaCl, pero pueden reconocerse algunas capas estratificadas típicas, debido a la subida de una protuberancia en los núcleos de las células columnares basales, así como las escamosas en su superficie. En la Figura 30B, se aprecia el daño de la estructura del epitelio corneal cuando se expone a la solución de LSS, debido a cambios evidentes en las células superficiales. No se observan cambios morfológicos o estructurales en las Figuras 30C y 30D, ni en la estructura ni en la integridad de la córnea, incluso cuando estaban visiblemente afectadas. Estos resultados indicaron que las formulaciones CL y DL2 presentaron una alta biocompatibilidad.

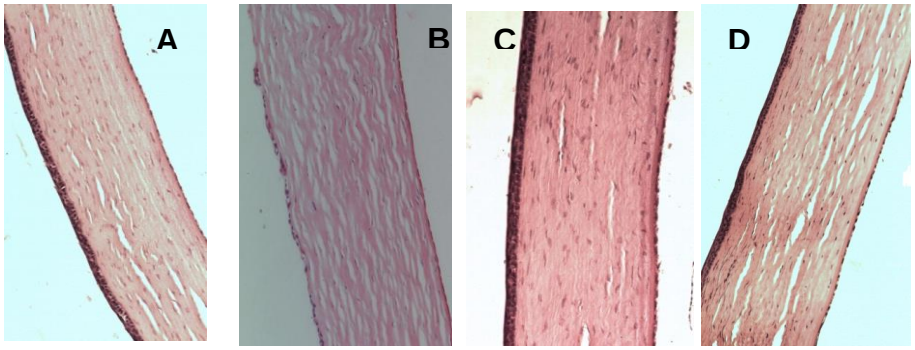


Figura 36. Secciones histológicas de la córnea de conejo extirpada mostrando epitelio y estroma teñidos con hematoxilina y eosina. (A) Solución de NaCl al 0,9% p/v; (B) Solución de LSS al 2% p/v; (C) CL y (D) DL2.

5. DISCUSIÓN

El aumento de la PIO sigue siendo el principal factor de riesgo en el glaucoma. El tratamiento principal de esta patología se basa en la administración de medicamentos tópicos para reducir la PIO, retrasando así

el daño al nervio óptico. Sin embargo, la aplicación periódica, debida a la deficiente biodisponibilidad ocular y a otros efectos secundarios a largo plazo, como alergia e intolerancia a los medicamentos, conllevan efectos negativos en la adherencia al tratamiento por parte del paciente, resultando en un inadecuado control de la PIO.

Los sistemas vesiculares, como los liposomas, constituyen una herramienta prometedora en la administración oftálmica, cobrando gran interés las formulaciones liposomales modificadas entre las que se incluyen los transfersomas. El potencial de las vesículas flexibles destinadas a la administración oftálmica de fármacos se centra en su capacidad para atravesar intactas la membrana corneal (Abrams et al., 2000) teniendo en cuenta que la membrana basal tiene una topografía compleja consistente en fibras estrechamente reticuladas entremezcladas con poros con diámetros inferiores a 200 nm. Por lo tanto, es crucial conocer las propiedades de deformabilidad de estas vesículas modificadas con el fin de modular la difusión a través de esta membrana.

Una interesante clasificación de los *nanocarriers* vesiculares ha sido publicada por Cevc, donde se enfatizó la capacidad de deformabilidad de la bicapa lipídica (Cevc, 2012). Los transfersomas se consideran de primera o segunda generación, en la que la deformabilidad ocupa un lugar por partida doble debido a la mezcla de dos o más componentes anfipáticos que comprenden la bicapa portadora: el componente primario (fosfolípido), componente básico estructural, y el secundario, el componente que aporta la flexibilidad, es decir, el tensioactivo (como Deo-Na o un tensioactivo no iónico). Esta composición proporciona una alta flexibilidad y permeabilidad a la bicapa por redistribución lateral o inserción/expulsión de las sustancias anfipáticas polares. La contribución de los transportadores de segunda generación consiste en la adición de al menos dos o más sustancias lipófilas polares, creando una bicapa sinérgica que aumenta la adaptabilidad de la membrana vesicular. Finalmente, como es el caso del presente estudio, la tercera generación de transportadores de fármacos ultradeformables aprovecha la redistribución adaptativa de aditivos hidrófilos cerca de la bicapa. Una sustancia soluble en agua, combinada con una sustancia desestabilizante de la bicapa, puede así modular la deformabilidad de la bicapa de la vesícula.

Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, es importante resaltar la relevancia de la composición y distribución de los componentes de la bicapa sobre la capacidad de deformación de estas vesículas ultradeformables. En primer lugar, la PC se purificó para mantener 0,068 mmol, en una relación molar constante con el activador de borde de, aproximadamente, 80:20 p/p, según Essa et al. (2004). La incorporación de CH en concentraciones menores a los liposomas convencionales promueve la deformabilidad de las vesículas. Estudios anteriores revelaron que la adición de EA en la formulación facilita el contacto de las vesículas con las membranas biológicas. Por otro lado, la presencia de carga superficial permite la repulsión electrostática entre ellas, aumentando la estabilidad de esta dispersión coloidal, según autores como González-Rodríguez y Rabasco (2011). Además, las vesículas que incorporan EA y fármacos positivamente ionizados presentan PdE más altos que otros, sin este componente cargado. Esto ha sido demostrado para fármacos tales como el succinato de sumatriptán y clorhidrato de lidocaína (González-Rodríguez et al., 2007; Villasmil-Sánchez et al., 2010). En el presente estudio, se ha introducido el mecanismo de extrusión como un método rápido y conveniente para estudiar el comportamiento de deformabilidad de los transfersomas cargados con TM. Como se ha comentado anteriormente, bajo presiones moderadas, se fuerza el paso de la dispersión líquida cristalina de MLV a través de filtros con tamaños de poro definidos. Como las capas concéntricas del liposoma multilaminar se deforman al cruzar a través del poro, se produce una rotura y ensamblamiento de las membranas. Si una preparación de liposomas se pasa repetidamente a través de un filtro, este proceso da lugar a una población de liposomas con un diámetro medio que refleja el del filtro usado. Como el diámetro de los liposomas se aproxima al del poro del filtro, cada vez que la vesícula atraviesa el filtro se requiere una menor deformación de su membrana para pasar a su través. Tras pasar 5 veces por el filtro, la mayoría de los liposomas pasan a través del filtro sin ningún cambio en su diámetro final (Tseng et al., 2007).

Con el fin de clarificar el comportamiento de las vesículas con respecto a las propiedades de deformabilidad, se ha aplicado un método de simulación *in vitro* tal y como ha sido publicado por otros autores (Liu et al., 2013; Carrer et al., 2014). En este caso, nuestra contribución se centró en analizar principalmente dos parámetros relacionados con las características de deformabilidad después del proceso de extrusión: el ID y la recuperación de PC. Con respecto a la capacidad de deformabilidad, el análisis ANOM mostró

que el incremento de la concentración de CH se traduce en una disminución de los valores de deformabilidad, como cabría esperar.

También han sido estudiados otros parámetros para justificar todo el comportamiento, de un modo globalizado: tamaño vesicular, carga superficial y porcentaje de TM encapsulado en las vesículas, analizando cómo influyen los componentes de la formulación en dichos parámetros.

Respecto al CH, éste juega un papel importante en la regulación de las propiedades de las membranas de los fosfolípidos. La incorporación de este lípido ha sido ampliamente utilizada para aumentar la estabilidad de la membrana, disminuir la permeabilidad y aumentar la encapsulación de fármacos hidrofílicos (Demetzos, 2008). El esterol rígido del CH debe ser acomodado por las cadenas lipídicas, reduciendo así la entropía de la cadena lipídica en fosfolípidos por encima de la Tc, como se demostró con la lecitina de huevo (Liu et al., 2000). Sin embargo, el efecto estabilizador de este lípido en la bicapa es diverso debido a las diferencias en su interacción con las moléculas fosfolipídicas y su capacidad para llenar huecos dentro de la membrana que proporcione un empaquetamiento adecuado que mejore la estabilidad de la bicapa. Esta afirmación está en concordancia con los parámetros optimizados en términos de PZ y valores de IP, donde los valores más bajos se obtuvieron con mayores cantidades de CH. Esta capacidad de empaquetado tiene un efecto directo en el tamaño de la vesícula, existiendo una relación inversamente proporcional entre el tamaño y la concentración de CH, como ya consolidamos en investigaciones anteriores (López-Pinto et al., 2005). Sin embargo, la extrusión parece inducir una alta curvatura en los liposomas extruidos que, a su vez, distorsionaría el empaquetamiento de las cadenas acilo y aumentaría el estado energético de las moléculas lipídicas. Por consiguiente, la estructura rígida del CH contribuye a dificultar el proceso de extrusión, sostenido por el tamaño más pequeño de los liposomas extruidos en comparación con los liposomas no extruidos (Bhardwaj y Burgess, 2010). Estos datos son claramente coherentes con estudios previos, donde la incorporación de CH en concentraciones superiores al 30% conduce a un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas de fosfolípidos, disminuyendo así la libertad de movimiento y aumentando la rigidez de la membrana (Coderch et al., 2000). Probablemente, este fenómeno se relacionó con los cambios en las propiedades de transición de fase de los fosfolípidos constituyentes.

En relación al activador de borde, también se seleccionarán los niveles más bajos de este componente con el fin de obtener vesículas más flexibles. Este comportamiento podría explicarse porque tanto CH como Deo-Na tienen una estructura molecular esteroidea hidrofóbica similar y compiten por los mismos sitios en la membrana del liposoma. CH es más lipofílico (log P ~ 7.17) que Deo-Na (log P ~ 3.50) y, por lo tanto, debe ser preferentemente incorporado en las membranas de liposomas, conduciendo a un desplazamiento de las moléculas de Deo-Na y a una disminución de las propiedades de deformabilidad. Se ha encontrado un comportamiento similar en liposomas cargados con dexametasona (Bhardwaj y Burgess, 2010). Esta relación entre ambos componentes de la bicapa puede visualizarse al analizar la recuperación de grupos fosfatos después del mecanismo de extrusión. Aunque se recomienda el uso de niveles más altos de CH y Deo-Na como factores principales en las formulaciones, sin embargo, la interacción entre ambos factores (interacción C) es significativa en el diseño estadístico, revelando la competencia entre estos factores principales y la relevancia de este estudio. La combinación de una fuerte deformabilidad de la vesícula junto a un gradiente transepidérmico es, por tanto, esencial para lograr el transporte espontáneo de vesículas a través de la membrana corneal.

La elasticidad de las vesículas también depende del tipo de tensioactivo. En este trabajo se utilizaron dos tensioactivos como activadores de borde diferentes (Tw20 y Deo-Na) con el objetivo de mejorar las propiedades de deformabilidad y contribuir a este gradiente. Formulaciones con Deo-Na mostraron valores de deformabilidad más altos que las formulaciones con Tw20. La alta elasticidad de la membrana ha resultado ser crucial para que una vesícula sea capaz de atravesar un poro más pequeño que su diámetro medio. Un transporte mediado por vesículas a través de membranas biológicas resulta de suma importancia para el éxito del transporte no invasivo. A pesar de tener mayor peso molecular (Tabla 23), el monolaurato de polioxietilensorbitano es menos voluminoso y no está ionizado, lo que contribuye a mejorar la capacidad de empaquetamiento en la bicapa, siendo el tamaño de la vesícula inferior. Sin embargo, cuando los liposomas ultradeformables se someten a un estrés local de deformación, los componentes individuales, inicialmente mezclados homogéneamente, están parcialmente separados en la bicapa. En este caso, el ingrediente más soluble (Deo-Na) se acumula dentro de los sitios de mayor curvatura,

causando el aumento del tamaño de la vesícula (Hofer et al., 2000). Además, ambos tensioactivos tienen un valor de HLB similar (16 aprox.), si bien su concentración micelar crítica (CMC) es muy diferente. Además, esta mezcla y reestructuración de los componentes de la bicapa se verificó considerando los valores de IP, porque se mantuvo la misma relación: la homogeneidad de muestras fue mayor en muestras de Deo-Na después del proceso de deformación. De nuevo, el volumen molecular y la ionización del tensioactivo tienen influencia sobre este parámetro. Además, la disminución en la elasticidad de las vesículas usando la misma concentración de tensioactivos puede deberse principalmente a la formación de micelas mixtas cuando la concentración del tensioactivo es más alta que la CMC, como se observó con Tw20 (CMC 60 mg/L) y Deo-Na (CMC 3,870 mg/L).

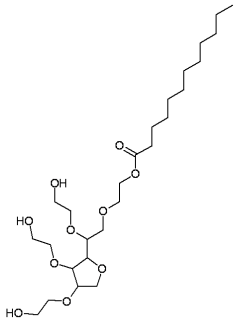
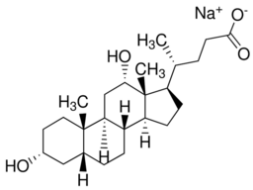
	Tw20	**Deo-Na**
Estructura química		
Peso molecular	1227,54	430,55
Tipo de tensioactivo	No iónico	Aniónico
HLB	16,7	16
CMC (mg/L)	60	3,87
Solubilidad en agua (g/L)	100	150

Tabla 23. Características estructurales y fisicoquímicas de Tween® 20 (Tw20) y desoxicolato sódico (Deo-Na). Estructura molecular de Tw20 y Deo-Na (www.sigmaaldrich.com).

Por regla general, las formulaciones de liposomas se caracterizan por una tendencia para acumular el fármaco hidrófilo (TM) en el compartimento

acuoso, ofreciendo las vesículas un ambiente lipofílico que facilita el paso a través de la membrana corneal. Al analizar los resultados del PdE, se ha observado un alto efecto estabilizador denotado con Deo-Na en la composición lipídica. Las moléculas de tensioactivos pueden intercalarse en la bicapa, alterando el empaque de la bicapa y la permeabilidad de los compuestos encapsulados a través las vesículas. Basándose en estos valores de HLB (aproximadamente 16) y en los valores de ionización del Deo-Na, puede explicarse la encapsulación de TM en las vesículas después del proceso de extrusión. El TM es un compuesto soluble en agua que contribuye al incremento de la cantidad de fármaco encapsulado en las vesículas, como se observó en este estudio y como fue reportado anteriormente (González-Rodríguez et al., 2007). Además, las características de ionización de este activo (pKa 9,21) podrían afectar a la estructura de la bicapa lipídica, como se demostró con terbinafina (Cevc, 2012). De acuerdo con este estudio, TM está principalmente protonado a pH 7,4 (pH < pKa). A este pH, el fármaco está unido a la bicapa, lo que conlleva una pobre eficiencia de reblandecimiento de la bicapa, pudiendo incluso endurecer las membranas lipídicas y eliminar el contenido de fármaco durante el proceso de extrusión. Por lo tanto, la reducción de la deformabilidad de la bicapa requiere más tiempo para formar nuevas vesículas después del proceso de extrusión, dando lugar a pérdidas del TM encapsulado. Además, como se discutió anteriormente, después de la extrusión, las vesículas con Deo-Na presentaban mayores dimensiones de tamaño que las formulaciones con Tw20. Este resultado, además de la unilaminaridad de las vesículas extruidas, contribuye a la mejora de la encapsulación en este tipo de liposomas (Liu et al., 2013).

Otro constituyente de la formulación que influye en los parámetros analizados es la adición de EA. La presencia de ésta en la composición vesicular tiene una importancia crucial en el PdE. Antes de la extrusión de las muestras, algunos componentes de la bicapa, como el CH en su nivel superior (27 µmol) y la EA (5 mg) han contribuido a la mejora del PdE, como ha sido previamente publicado (Villasmil-Sánchez et al., 2010). La EA está localizada en la bicapa lipídica y su presencia contribuye también a incrementar el PdE. Esto ocurre porque la EA puede afectar a características específicas tal como la permeabilidad de la membrana o la densidad de la carga eléctrica, como fue postulado por Kotynska y Figaszewski (2007). Su influencia sobre el tamaño puede justificarse por la posible asimetría de

distribución de la EA en la bicapa, dando lugar a vesículas superiores en tamaño, como lo demostraron Villasmil et al. (2013).

En la etapa de optimización se ha utilizado como herramienta las medias marginales, permitiendo optimizar individualmente cada una de las respuestas anteriormente analizadas. Sin embargo, la principal desventaja que encontramos cuando se utilizó esta técnica consistió en la incapacidad para estimar las interacciones; a consecuencia de ello, se observaron errores de predicción superiores al 10% cuando se realizaron los experimentos confirmatorios. En cuanto a la técnica de regresión múltiple, el principal inconveniente de esta metodología fue la selección de la ecuación apropiada a utilizar en el modelo predictivo, siendo una fuente habitual de errores en la fase de optimización.

No obstante, aunque posteriormente se requirió el uso de otra técnica complementaria para clarificar el grado de contribución de las interacciones, bajo criterio subjetivo, se seleccionó la formulación óptima de transfersomas con el objetivo de alcanzar la máxima deformabilidad, recuperación de PC, tamaño de vesícula y porcentaje de encapsulación después de la extrusión, realizándose con esta formulación optimizada un ensayo de permeación *in vitro* que demostró la ventaja de los liposomas elásticos frente a los liposomas convencionales en términos de liberación sostenida de TM tras el paso de las vesículas a través de la membrana de permeación. Además, se genera una fuerza de atracción electrostática entre los liposomas cargados positivamente y la membrana cargada negativamente. Así, pensamos que los liposomas se adsorberían a la superficie corneal y transferirían su fármaco asociado directamente a la membrana de la célula epitelial corneal. Los transfersomas podrían cruzar el epitelio corneal debido a su contenido en sustancias activadoras que les confiere ultradeformabilidad a la membrana, facilitando así el paso del fármaco a través de la córnea (Hosny et al., 2009).

La aplicación de RNA como herramienta de optimización para solventar estos problemas resultó muy eficaz. La utilización parcial de los datos para capacitar la red (60-70% de los datos se utilizan en la fase de aprendizaje y 30-40% en la fase de validación) es imprescindible para su aprendizaje adecuado para la posterior validación. Se entrenó la red utilizando de 5 a 14 neuronas en la capa oculta obteniendo los mejores resultados en términos de error de validación cuando el número de neuronas ocultas fue de 12, construida con cinco entradas y ocho salidas, concluyendo que esta

herramienta funciona correctamente para predecir el patrón de comportamiento o parámetros de formulación de formulaciones de liposomas deformables. Los resultados de los errores de predicción para los valores experimentales *vs* predichos utilizando el modelo RNA confirmó su buen rendimiento; y se comparó con el de la regresión lineal múltiple y las medias marginales, mostrando las RNA una mejor capacidad predictiva y precisión que el resto.

Además, en el presente estudio, se investigó la permeación *in vitro* y el efecto ocular *in vivo* de diferentes tipos de vesículas lipídicas cargadas con TM: liposomas convencionales (CL) y vesículas deformables con un activador de borde (DL1) o un activador de borde conjuntamente con un potenciador de permeación (DL2). La composición de CL derivó de la fase de optimización desarrollada en este capítulo, y la de las vesículas DL de una formulación optimizada que se desarrollará en el capítulo II. Se evaluaron las propiedades en términos de estructura, tamaño de la vesícula, carga superficial, IP, porcentaje de fármaco atrapado, elasticidad, coeficiente de reparto, el comportamiento de liberación, los estudios de permeación *in vitro* y los estudios corneales *in vivo*. Teóricamente, la composición DL2 (un potenciador de la permeación, etanol, junto con Deo-Na como activador de borde) hace que estas vesículas proporcionen características de permeación mejoradas en comparación con DL1 y CL. El etanol interactúa con las moléculas lipídicas de los grupos de la cabeza polar, dando como resultado una temperatura de transición de fase (Tm) reducida de los lípidos corneales y una mayor fluidez, que proporciona un aumento en la permeabilidad de la membrana. El etanol también puede proporcionar maleabilidad y flexibilidad a las vesículas y les permite forzar más fácilmente y penetrar en las capas más profundas del ojo. Además, durante la permeación, el activador de borde (Deo-Na) se separa de la bicapa lipídica y se desplaza a las zonas de mayor curvatura/estrés, mientras que las moléculas anfifílicas hidrofóbicas enriquecen las regiones de la bicapa con una curvatura más pequeña. Estos reordenamientos constituyen la causa de la disminución de la energía elástica de la membrana y la formación de estructuras más deformables que CL en hasta cinco órdenes de magnitud. En este sentido, DL2 reportó valores más altos, lo que implica una elasticidad mejorada en comparación con CL y DL1, como revelan las imágenes del TEM, debido a la combinación de efecto del contenido de etanol y Deo-Na en estas vesículas.

Sin embargo, no existe correlación entre las propiedades de elasticidad y la permeabilidad de DL. La influencia de la cantidad total de lípidos en la penetración del fármaco y, por lo tanto, el tamaño de la vesícula, fue evidente. Los resultados observados de CL son correlativos con los resultados de permeación *in vitro*, que mostró una liberación lenta y sostenida de TM. Con respecto a la composición vesicular, la presencia de CH en diferente proporción molar puede afectar a la difusión del fármaco. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que el porcentaje en moles fue mayor en DL2 (44,17 frente a 27,08%) y que la presencia de este esteroide en una bicapa de lípidos influye fuertemente en sus propiedades termodinámicas y mecánicas mediante la disminución de la permeabilidad pasiva de la bicapa. La liberación de TM fue más lenta e incompleta a medida que aumentó la concentración de CH (Khajeh y Modarress, 2014). Además, TM tiene un alto coeficiente de partición (log P 1,34 - 1,44) y el mecanismo de solubilidad-difusión es probablemente un factor clave en la permeación de moléculas de TM (Boggara y Krishnamoorti, 2010). La disposición del fármaco en la bicapa favorece la difusión al medio de disolución mientras que el fármaco atrapado en la fase acuosa se mantiene como depósito en la vesícula durante mucho tiempo, como ocurre en CL.

El efecto hipotético de las características de ionización de TM en medio acuoso sobre la difusión a través de bicapas lipídicas puede explicarse de acuerdo con el estudio propuesto por Ulander y Haymet (2003) para el ácido valproico en vesículas de DPPC. TM tiene un valor de pKa de 9,21 y se protona principalmente a pH 7,4. Cuando esta molécula cargada se acerca a la bicapa, las cabezas de los grupos se polarizan y, al mismo tiempo, permiten que los entrantes de agua en la bicapa relajen la penetración electrostática mediante la desolvatación. Contribuciones adicionales importantes fueron propuestas por Carrozzino y Khaledi (2005) los cuales postularon el efecto del pH en las interacciones de fármacos y bicapas lipídicas. Las interacciones electrostáticas debidas a los grupos funcionales persistentes en el TM tienen una función clave en el coeficiente de partición, que depende del grado de ionización de solutos, determinado por el pH. A pH fisiológico, el TM está cargado positivamente y es atraído electrostáticamente por lípidos de los liposomas que llevan una carga neta negativa. Este hecho podría explicar los valores de PZ prácticamente neutros obtenidos en este estudio.

Por último, los resultados *in vivo* revelaron que una sola aplicación tópica de liposomas de PC cargados con TM (0,5 mg/mL) podría reducir eficazmente la PIO en los ojos de conejo durante al menos 7 h. Este efecto reductor de la PIO fue significativamente mayor que la administración tópica de la solución de TM 0,5 mg/mL, y el mismo efecto que el tratamiento estándar actual en pacientes que padecen glaucoma (5 mg/mL). El mecanismo de penetración a través de la córnea puede explicar el comportamiento de esta formulación. Un mecanismo combinado transcelular y paracelular podría ser atribuible al TM en función de sus propiedades de reparto y solubilidad en agua. Los estudios de permeabilidad indicaron que como el epitelio corneal es lipófilo, de baja porosidad y relativamente alto en tortuosidad (Malhotra y Majumdar, 2001), un fármaco de rápida penetración debe poseer un coeficiente de reparto logarítmico mayor que 1 para lograr una tasa de penetración suficiente. En este estudio, para los fármacos hidrófilos, como el TM, con un valor de coeficiente de reparto en el rango log 1,34-1,44, el epitelio y el estroma contribuyen a una mejora de la permeación. Por otra parte, se ha demostrado que el etanol y Deo-Na mejoran la penetración transcorneal del fármaco. Ciertamente, se han reportado sus beneficios potenciales en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos oftálmicos. El Deo-Na, una sal biliar, es un tensioactivo aniónico. En general, estos tipos de adyuvantes, a bajas concentraciones, se añaden en la bicapa lipídica, con los consiguientes cambios en las propiedades físicas de las membranas celulares (Moghimipour et al., 2015). Cuando la bicapa se satura, se forman las micelas mixtas, provocando la eliminación de los fosfolípidos de las membranas celulares y la solubilización de la membrana (Stojancevic et al., 2013). Además, Deo-Na puede incrementar el transporte paracelular por disrupción de los hemidesmosomas o por unión a Ca^{++} en las regiones de uniones estrechas (Shaikh et al., 2012). Simultáneamente, el etanol puede desordenar la estructura de la bicapa lipídica ocular y mejorar su fluidez lipídica como ha sido demostrado por otros autores (López-Pinto et al., 2005; Patra et al., 2006).

Como era de esperar, las formulaciones ensayadas se toleraron adecuadamente en la superficie ocular. Sin embargo, su uso se debe considerar con precaución ya que los potenciadores de la penetración ocular pueden causar cambios ultraestructurales en el epitelio corneal. Los estudios mostraron que Deo-Na es intensamente citotóxico, y con una concentración del 1% ya es irritante y causa daño corneal (Saettone et al., 1996). De

manera similar, el etanol puede causar un efecto irritante en la córnea en su uso repetitivo.

En cuanto a la reducción de la PIO en los ojos de los conejos ensayados, los resultados obtenidos son alentadores. A fecha de hoy, no existen otros estudios que demuestren un efecto tan significativo de la liberación sostenida de TM usando liposomas en el ojo del animal, a una concentración de TM diez veces menor que la solución de control. El tamaño de estos *nanocarriers* también podría ser una opción clave en la administración de fármacos a través de las diversas estructuras anatómicas del ojo (conjuntiva y esclerótica) para el sitio diana (cuerpo ciliar) de manera más eficiente, con un aumento de la biodisponibilidad.

Ciertamente, en el caso de los medicamentos oftálmicos, es difícil desarrollar un modelo predictivo *in vitro* fiable. A pesar de la existencia de restricciones pre-corneales del ojo, tal como el aclaramiento continuo de las formas de dosificación y el fármaco liberado a través del drenaje de lágrimas, diluyente de lágrimas y lagrimeo, el estudio mostró una buena correlación en términos de parámetros de permeación *in vitro* y efecto terapéutico obtenido. Esta concordancia hace que el protocolo de permeación seleccionado sea apropiado para estudios adicionales utilizando esta ruta. Además, los datos de experimentos *in vitro* son útiles para una extrapolación racional a la predicción *in vivo* con el fin de minimizar el uso de pruebas en animales, lo cual está limitado por razones éticas, económicas y técnicas.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

De todos los estudios realizados, se pudo concluir que:

- Se ha formulado y optimizado un nuevo sistema vesicular deformable (transfersomas) con la finalidad de conseguir una adecuada liberación oftálmica del TM. La formulación optimizada de TM estaba compuesta por TM 0,5 mg/mL, PC 68 µmol, CH 20 µmol, Deo-Na 23,2 mmol, EA 18,56 mmol, adicionándose el fármaco en el compartimento acuoso de los liposomas. El contenido general de PC en la formulación fue del 100%, lo que asegura que la mezcla de lípidos usada en la preparación podría formar realmente las vesículas después de la extrusión. Curiosamente, se ha encontrado que la relación de lípidos/tensioactivo y el tipo de tensioactivo son los principales factores clave para determinar la flexibilidad de la bicapa de los transfersomas.

- La optimización de las respuestas individuales llevadas a cabo mediante medias marginales permitió determinar aquellos niveles de los factores que en teoría alcanzan los valores óptimos para las respuestas requeridas. No obstante, se han aplicado también otras herramientas estadísticas como análisis de regresión y redes neuronales, con el fin de minimizar las predicciones de error en la investigación, siendo ésta última la mejor alternativa. Este estudio ha demostrado que la MLR usando la ecuación polinomial de primer orden y la red de retro-propagación (RNA) *feed-forward* son herramientas útiles para entender los efectos de varios parámetros de formulación en la preparación de liposomas cargados de TM y predecir la mejor composición para una respuesta particular. Además, un método es complementario al otro, teniendo cada uno sus propias ventajas. El uso de RNA se origina por la necesidad de predicciones altamente precisas de los valores de los parámetros sin imponer un modelo predefinido. Aunque otros métodos, como MLR en este estudio, dan buenos resultados, no son tan adecuados como los ofrecidos por RNA en algunos casos. Los resultados de este estudio indicaron que la selección apropiada del algoritmo de entrenamiento es esencial para el modelado exitoso de datos por RNA. De acuerdo con los resultados, las RNAs se pueden utilizar como una herramienta poderosa en la formulación de productos farmacéuticos, de modo que las tareas de desarrollo se pueden realizar rápida y eficientemente con un aumento de productividad, consistencia y calidad. Existen arquitecturas más complejas, utilizando diversas redes neuronales de diferentes configuraciones trabajando juntas que obtendrían excelentes resultados, pero a un mayor coste, para el diseño, el desarrollo de los parámetros y la formación de todas las redes. Los modelos para caracterizar parámetros, tales como tamaño de vesícula, IP, PZ y PdE de TM fueron entrenados satisfactoriamente por RNA para todas las arquitecturas y algoritmos de entrenamiento. Estos prototipos fueron evaluados con respecto a su capacidad predictiva y no se observaron diferencias significativas en el proceso de validación.

- Los ensayos con las formulaciones optimizadas descritas mostraron que el efecto combinatorio del potenciador de penetración (etanol) y el tensioactivo (Deo-Na) aumentó la elasticidad de las vesículas. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados *in vivo*, los liposomas convencionales mostraron un efecto hipotensor extendido en el tiempo

en comparación con otras formulaciones liposomales. El mantenimiento del sistema de depósito en la membrana corneal se convierte en crucial para prolongar la reducción de la PIO. El trabajo actual enfatiza que el uso de dosis más bajas de TM (0,05% p/v) mejora poderosamente los resultados farmacológicos y toxicológicos de otras formulaciones oftálmicas liposomales de TM.

- En general, estos hallazgos *in vivo* indican que los liposomas cargados de TM tienen un gran potencial para vehiculizar el fármaco a través de la membrana corneal. Sin embargo, estos resultados demostraron que, además de la caracterización y evaluación *in vitro*, también las características fisiológicas y aspectos toxicológicos del epitelio corneal deben tenerse en cuenta para predecir adecuadamente el comportamiento *in vivo.*

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-All NH, Mahmoud MAW, Abd-Ellah HN. Geometrical properties of Pareto distribution. Appl Math Comput. 2003;145(2):321-339.

Abdelbary AA, Abd-Elsalam WH, Al-Mahallawi AM. Fabrication of novel ultradeformable bilosomes for enhanced ocular delivery of terconazole: in vitro characterization, ex vivo permeation and in vivo safety assessment. Int J Pharm. 2016;513(1):688-696.

Abdel-Maaboud IM, Abdel-Wadooda HM, Mousab HS. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. Talanta. 2014;130:495–505.

Abraham A, Grosan C, Tigan S. Pharmaceutical drug design using dynamic connectionist ensemble networks. In: Itawa S, ed. Studies in Computational Intelligence, vol. 123. Berlin: Springer Heidelberg. 2008:221-231.

Abrams GA, Goodman SL, Nealey SF, Franco M, Murphy CJ. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. Cell Tissue Res. 2000;299(1):39–46.

Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. J Pharm Biomed Analysis. 2000;22:717-727.

Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. Int J Pharm. 2005;290(1):155–159.

Ajmani S, Janardhan S, Viswanadhan VN. Toward a general predictive QSAR model for gamma-secretase inhibitors. Mol Divers. 2013;17(3):421-434.

Aksu B, Paradkar A, De Matas M, Özer A, Güneri T, York P. A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. Pharm Dev Tech. 2013;18:236-245.

Al-Hanbali O, Onwuzo NM, Rutt KJ, Dadswell CM, Moghimi SM, Hunter AC. Modification of the Stewart biphasic colorimetric assay for stable and accurate quantitative determination of Pluronic and Tetronic block copolymers for application in biological systems. Anal Biochem. 2007;361(2):287–293.

Arulsudar N, Subramanian N, Murthy RSR. Comparison of artificial neural network and multiple linear regression in the optimization of formulation parameters of leuprolide acetate loaded liposomes. J Pharm Pharmac Sci. 2005;8(2):243-258.

Ascenso A, Raposo S, Batista C, Cardoso P, Mendes T, Praça FG, Bentley MV, Simões S. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. Int J Nanomedicine. 2015;10:5837-5851.

Barrentine LB. An introduction to design of experiments. A simplified approach. ASQ Quality Press, Milwaukee (1999).

Baydoun L, Furrer P, Gurny R, Müller-Goymann CC. New surface-active polymers for ophthalmic formulations: evaluation of ocular tolerance. Eur J Pharm Biopharm. 2004;58(1):169-175.

Bhardwaj U, Burgess DJ. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. Int J Pharm. 2010;388(1):181–189.

Bhowmik M, Das S, Chattopadhyay D, Ghosh LK. Study of thermosensitive in-situ gels for ocular delivery. Scientia Pharmaceutica. 2011;79(2):351-358.

Boggara MB, Krishnamoorti R. Partitioning of nonsteroidal antiinflammatory drugs in lipid membranes: a molecular dynamics simulation study. Biophys J. 2010;98(4):586-595.

Bundgaard H, Buur A, Chang SC, Lee V. Timolol prodrugs: synthesis, stability and lipophilicity of various alkyl, cycloalkyl and aromatic esters of timolol. Int J Pharm. 1988;46(1):77–88.

Carrer DC, Higa LH, Tesoriero MVD, Morilla MJ, Roncaglia DI, Romero EL. Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014;121:281–289.

Carrozzino JM, Khaledi MG. pH effects on drug interactions with lipid bilayers by liposome electrokinetic chromatography. J Chromat A. 2005;1079(1):307-316.

Cevc G. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. In: Lipowsky R, ed. Handbook of physics of biological systems. Vol. I. Amsterdam: Elsevier;1995:441–466.

Cevc G. Rational design of new product candidates: the next generation of highly deformable bilayer vesicles for noninvasive, targeted therapy. J Control Release. 2012;160(2):135–146.

Chen H, Pan H, Li P, Wang H, Wang X, Pan W, Yuan Y. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. Colloids Surf ***B Biointerfaces***. 2016;143:455-462.

Chen YY, Lu YH, Ma CH, Tao WW, Zhu JJ, Zhang X. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. Biomed Pharmacother. 2017; (87):82-91.

Chimanuka B, Gabriels M, Detaevernier MR, Plazier-Vercemmen JA. Preparation of beta-artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria infected mice. J Pharm Biomed Anal. 2002;28(1):13–22.

Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. J Control Release. 2000;68(1):85–95.

Corvera E, Mouritsen OG, Singer MA, Zuckermann MJ. The permeability and the effect of acyl chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. Biochim Biophys Acta. 1992;1107(2):261-270.

Demetzos C. Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. J Liposome Res. 2008;18(3):159–173.

Di Marzio L, Marianecci C, Rinaldi F, Esposito S, Carafa M. Deformable surfactant vesicles loading ammonium glycyrrhizinate: characterization and in vitro permeation studies. Lett Drug Des Discov. 2012;9(5):494–499.

Díaz-Rodríguez P, Landín M. Smart design of intratumoral thermosensitive β-lapachone hydrogels by Artificial Neural Networks. Int J Pharm. 2012;433(1):112-118.

Doppalapudi S, Mahira S, Khan W. Development and in vitro assessment of psoralen and resveratrol co-loaded ultradeformable liposomes for the treatment of vitiligo. J Photochem Photobiol B. 2017;174:44-57.

Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther. 1944;82(3):377-390.

Duangjit S, Obata Y, Sano H, Onuki Y, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Takayama K. Comparative study of novel ultradeformable liposomes: menthosomes, transfersomes and liposomes for enhancing skin permeation of meloxicam. Biol Pharm Bull. 2014;37(2):239-247.

Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. Biomaterials. 2006;27(18)3491-3496.

El Zaafarany GM, Awad GA, Holayel SM, Mortada ND. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. Int J Pharm. 2010;397(1):164-172.

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhance skin delivery. Int J Pharm. 2006;322(1):60-66.

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. Int J Pharm. 2007;332(1):1–16.

Essa EA, Bonner MC, Barry BW. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. J Control Release. 2004;95(3):535–546.

Fang Y, Tsai Y, Wu P, Huang Y. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. Int J Pharm. 2008;356(1):144–152.

Furlanetto S, Orlandini S, Aldini G, Gotti R, Dreassi E, Pinzauti S. Designing experiments to optimize and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. Anal Chim Acta. 2000;413(1):229-239.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov Today. 2013;18(5):290–297.

Ghaffari A, Abdollahi H, Khoshayand MR, Soltani Bozchalooi I, Dadgar A, Rafiee-Tehrani M. Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. Int J Pharm. 2006;327:126-138.

Ghanbarzadeh S, Arami S. Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium via conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes. Biomed Res Int. 2013:616810. doi: 10.1155/2013/616810.

Ghodeswar P, Rai GK. Transdermal delivery of anti-fungal drug using elastic liposomes. Int J Adv Pharm Sci. 2010;1:369-374.

Gillet A, Grammenos A, Compère P, Evrard B, Piel G. Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. Int J Pharm 2009;380(1):174–180.

Gløgård C, Stensrud G, Hovland R, Fossheim S, Klaveness J. Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and in vitro relaxivity. Int J Pharm. 2002;233(1):131-140.

González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Canca D, Rabasco AM. Deformability properties of timolol loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. Drug Dev Ind Pharm. 2016;42(10)1683-1694.

González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-Rodríguez PL, Rabasco AM. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. Int J Pharm. 2007;337(1):336-345.

González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. J Pharm Sci. 2012;101(10):3845-3863.

González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. Expert Opin Drug Deliv. 2011;8(7):857-871.

Gotti R, Furlanetto S, Andrisano V, Cavrini V, Pinzauti S. Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulphate. J Chromatography. 2000;875(1):411-422.

Gracià RS, Bezlyepkina N, Knorr RL, Lipowsky R, Dimova R. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. Soft Matter. 2010;6(7):1472–1482.

Grosan C, Abraham A, Tigan S. 8th International Symposium on Symbolic and Numeric Algorithms for Scientific Computing (SYNASC'06), Timisoara, Romania, IEEE CS Press. 2006:365-371.

Gupta A, Aggarwal G, Singla S, Arora R. Transfersomes: a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery of sertraline: Development, characterization and performance evaluation. Sci Pharm. 2012;80(4):1061–1080.

Gupta PN, Mishra V, Rawat A, Dubey P, Mahor S, Jain S, Vyas SP. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. Int J Pharm. 2005;293(1):73-82.

Hamming RW. Error detecting and error correcting codes. Bell Syst Techn J. 1950;29(2):147-60.

Hao J, Wang X, Bi Y, Teng Y, Wang J, Li F, Liu J. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014;114:111-120.

Hofer C, Hartung R, Gobel R, Deering P, Lehmer A, Breul J. New ultradeformable drug carriers for potential transdermal application of interleukin-2 and interferon-alpha: theoretical and practical aspects. World J Surg. 2000;24(10):1187–1189.

Hopfield JJ. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. Proc Natl Acad Sci. 1982;79(8):2554-8.

Hosny KM. Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin. AAPS Pharm Sci Tech. 2009;10(4):1336–1342.

Huang Y, Yao Q, Zhu C, Zhang X, Qin L, Wang Q, Wu C. Comparison of novel granulated pellet-containing tablets and traditional pellet-containing tablets by artificial neural networks. Pharm Dev Technol. 2015;20(6):670-675.

Ioele G, De Luca M, Dinç E, Oliverio F, Ragno G. Artificial neural network combined with principal component analysis (ANN-PCA) for resolution of complex pharmaceutical formulations. Chem Pharm Bull. 2011;59(1):35-40.

Khajeh A, Modarress H. The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer. Biochim Biophys Acta. 2014;1838(10):2431-2438.

Kohonen T. An adaptive associative memory principle. IEEE Transactions on Computers. 1974;23(4):444-5.

Kotynska J, Figaszewski ZA. Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholinestearylamine liposome membrane. Biophys Chem. 2007;127(1):84–90.

Krajišnik D, Stepanović-Petrović R, Tomić M, Micov A, Ibrić S, Milić J. Application of artificial neural networks in prediction of diclofenac sodium release from drug-modified zeolites, physical mixtures and antiedematous activity assessment. J Pharm Sci. 2014;103(4):1085-1094.

Lasic DD. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol. 1998;16(7):307–321.

Lee KY, Shim J, Lee HG. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. Carbohydrate Polymer. 2004;56(2):251-254.

Lei W, Yu C, Lin H, Zhou X. Development of tacrolimus loaded transfersomes for deeper skin penetration enhancement and therapeutic effect improvement in vivo. Asian J Pharm Sci. 2013;8(6):333–345.

Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. Pharmaceutical experimental design. Marcel Dekker, New York, 1999.

Liang X, Mao G, Ng KYS. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. J Colloid Interf. 2004;278(1):53–62.

Liu D, Hu H, Lin Z, et al. Quercetin deformable liposome: preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. J Photochem Photobiol B Biol. 2013;127:8–17.

Liu DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2000;172(1):57-67.

López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int J Pharm. 2005;298(1):1-12.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. New “drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes” formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. Int J Pharm. 2010;395(1):222-231.

Mahmood S, Taher M, Mandal UK. Experimental design and optimization of raloxifene hydrochloride loaded nanotransfersomes for transdermal application. Int J Nanomed. 2014;9:4331-4346.

Malhotra M, Majumdar DK. Permeation through cornea. Indian J Exper Biol. 2001;39:11–24.

Maurya SD, Tilak VK, Dhakar RC, Singh A, Maurya G. Enhanced transdermal delivery of indinavir sulfate via transfersomes. Int J Compr Pharm. 2010;1(6):1-7.

McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of ideas immanent in nervous activity. Bull Math Biol. 1943;5:115-133.

Meissner JM, Toporkiewicz M, Czogalla A, Matusewicz L, Kuliczkowski K, Sikorski AF. Novel antisense therapeutics delivery systems: in vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. J Control Release. 2015;220:515-528.

Mir-Palomo S, Nácher A, Díez-Sales O, Busó MOV, Caddeo C, Manca ML, Saurí AR. Inhibition of skin inflammation by baicalin ultradeformable vesicles. Int J Pharm. 2016;511(1):23-29.

Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-enhancing effects of bile salts. Molecules. 2015;20(8):14451-14473.

Mohammedi H, Shyale S, Shanta SM. Physico-chemical characterization, UV spectrophotometric method development and validation studies of timolol maleate. IJPSRR. 2011;6(2):163-166.

Morris RG, Hebb DO. The organization of behavior. Brain Res Bull. 1999;50(5-6):437.

Natarayan JV, Ang M, Darwitan A, Chattopadhyay S, Wong TT, Venkatraman SS. Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. Int J Nanomedicine. 2012;7:123-131.

Nemati P, Imani M, Farahmandghavi F, Mirzadeh H, Marzban-Rad E, Nasrabadi AM. Dexamethasone releasing cochlear implant coatings: application of artificial neural networks for modelling of formulation parameters and drug release profile. J Pharm Pharmacol. 2013;65(8):1145-1157.

Oh E, Jin SE, Kim JK, Park JS, Park Y, Kim CK. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. Eur J Pharm Sci. 2011;44(1):149–157.

Paolino D, Lucania G, Mardente D, Alhaique F, Fresta M. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. J Control Release. 2005;106(1-2):99-110.

Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, Holopainen J, Karttunen M. Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. Biophys J. 2006;90(4):1121–1135.

Peira E, Trotta M, Carlotti ME, Gallarate M, Chirio D. Elastic positively-charged liposomes for topical administration of acyclovir. J Drug Del Sci Tech. 2007;17(5):321–324.

Pérez AP, Altube MJ, Schilrreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, Morilla MJ. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. Colloids Surf B Biointerfaces. 2016;139:190-198.

Porth CM. Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp 1295-1329. 2007.

Prajapati ST, Patel CG, Patel CN. Transfersomes: A vesicular carrier system for transdermal drug delivery. Asian J Biochem Pharmac Res. 2011;1(2):507-524.

Raj R, Raj PM, Ram A. Lipid based noninvasive vesicular formulation of cytarabine: nanodeformable liposomes. Eur J Pharm Sci. 2016;88:83-90.

Rajan R, Shoma J, Mukund V, Vasudevan D. Transfersomes: a vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. J Adv Pharm Technol Res. 2011;2(3):138-143.

Ramos G, Ramírez-Amador S, Esquivel M, Loría A, Vega-Baudrit J, Sibaja M, Madrigal-Carballo S. Estudio a nanoescala de las interacciones entre liposomas recubiertos con biopolímeros y superficies sólidas de biomateriales. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2010;11(7):596-606.

Rathore KS, Nema RK, Sisodia SS. Preparation and characterization of timolol maleate ocular films. Int J Pharm Tech Res. 2010;2(3):1995-2000.

Rodríguez-Jaume MJ, Mora Catalá R. Análisis de regresión múltiple. Técnicas de Investigación Social II. 2001.

Romero EL, Morilla MJ. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. Int J Nanomed. 2013;8:3171-3186.

Rosenblatt F. Principles of neurodynamics: perceptrons and the theory of brain mechanisms. Neural Computation. 1957;2:25-34.

Saettone MF, Chetoni P, Cerbai R, Mazzanti G, Braghiroli L. Evaluation of ocular permeation enhancers: In vitro effects on corneal transport of fourβ-blockers, and in vitro/in vivo toxic activity. Int J Pharm. 1996;142(1):103-113.

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug Discov Today. 2008;13(3):144-151.

Sánchez-Lafuente C, Rabasco AM, Álvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M. Diseño experimental (I): concepto, aplicaciones y metodología. Ind Farm. 2000;15(6):97-101.

Sánchez-Lafuente C, Rabasco AM, Álvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M. Diseño experimental (II): estrategias. Aplicación práctica. Ind Farm. 2001;16(1):101-106.

Schatzlein A, Cevc G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). Br J Dermatol. 1998;138(4):583-592.

Shaikh MSI, Derle ND, Bhamber R. Permeability enhancement techniques for poorly permeable drugs: A review. J Appl Pharm Sci. 2012;2:34-39.

Shen Y, Tu J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. AAPS J. 2007;9(3):371-377.

Shihui Y, Qi-Ming W, Xin W, Dandan L, Wenji Z, Tiantian Y, Xinggang Y. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for opthalmic delivery of timolol maleate. Int J Pharm. 2015;480:128-136.

Siafakaa PI, Titopouloua A, Koukarasb EN, Kostoglou M, Koutris E, Karavas E, Bikiaris DN. Chitosan derivatives as effective nanocarriers for ocular release of timolol drug. Int J Pharm. 2015;495(1):249-264.

Singh G, Pai RS, Devi VK. Response surface methodology and process optimization of sustained release pellets using Taguchi orthogonal array design and central composite design. J Adv Pharm Tech Res. 2012;3(1):30-40.

Song CK, Balakrishnan P, Shim CK, Chung SJ, Chong S, Kim DD. A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation. Coll Surf B Biointerf. 2012;92:299-304.

Stojancevic M, Pavlovic N, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. Front Life Sci. 2013;7(3-4):112-122.

Stone RA, Veevers A. The Taguchi influence on designed experiments. J Chemometr. 1994;8(2):103-110.

Subramanian N, Yajnik A, Murthy RS. Artificial neural network as an alternative to multiple regression analysis in optimizing formulation parameters of cytarabine liposomes. AAPS Pharm Sci Tech. 2004;5(1):11-19. Doi:10.1208/pt050104.

Taguchi G. Quality engineering series. Japanase Standards Association/American Supplier Institute, Dearborn, 1991.

Taguchi G. System of experimental design. Engineering methods to optimize quality and minimize costs. Kraus International, White Plains, 1987.

Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. J Control Release. 2000;65(3):403-418.

Tsai MJ, Huang YB, Fang JW, Fu YS, Wu PC. Preparation and characterization of naringenin-loaded elastic liposomes for topical application. PloS one. 2015;10(7):e0131026.

Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Liu YY. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. J Med Biol Engineer. 2007;27(1):29-34.

Ulander J, Haymet ADJ. Permeation across hydrated DPPC lipid bilayers: simulation of the titrable amphiphilic drug valproic acid. Biophys J. 2003;85(6):3475-3484.

Villasmil S, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Thermal and 31P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in Phosphatidylcholine/Cholesterol liposomes. Comparative 31P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. Coll Surf B Biointerfaces. 2013;105:14-23.

Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Salas SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. Drug Dev Ind Pharm. 2010;36(6):666-675.

Volotinen M, Mäenpää J, Kautiainen H, Tolonen A, Uusitalo J, Ropo A, Aine E. Ophthalmic timolol in a hydrogel vehicle leads to minor inter individual variation in timolol concentration in aqueous humor. Eur J Pharm Sci. 2009;36(2):292-296.

Widrow B, Hoff ME. "Adaptive switching circuits". Institute of Radio Engineers, Western Electronic Show and Convention, Convention Record, Part 4. 1960:96-104.

Woolfson AD, Umrethia ML, Kett VL, Malcolm RK. Freeze-dried, mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide, dapivirine: optimisation by an artificial neural network. Int J Pharm. 2010;388(1-2):136-143.

Wu J, Luo W, Wang X, Sun C, Li H. A new application of WT-ANN method to control the preparation process of metformin hydrochloride tablets by near infrared spectroscopy compared to PLS. J Pharm Biomed Analysis. 2013;80:186-191.

Wu Y, Wu A. Taguchi methods for robust design. Amer Soc Mechan Engin, New York, 2000.

Yasuda A, Onuki Y, Kikuchi S, Takayama K. Self-organizing map analysis using multivariate data from theophylline powders predicted by a thin-plate spline interpolation. J Pharm Sci. 2010;99(11):4535-4542.

Yu S, Wang QM, Wang X, Liu D, Zhang W, Ye T, Yang X, Pan W. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for opthalmic delivery of timolol maleate. Int J Pharm. 2015;480(1):128-136.

Zeb A, Qureshi OS, Yu CH, Akram M, Kim HS, Kim MS, Kim JK. Enhanced anti-rheumatic activity of methotrexate-entrapped ultradeformable liposomal gel in adjuvant-induced arthritis rat model. Int J Pharm. 2017;525(1):92-100.

Zuidam NJ, Vrueh R, Crommelin DJA. Characterization of liposomes. In: Torchilin VP, Weissig V, eds. Liposomes. 2nd edn. Oxford: Oxford University Press; 2007:31-78.

CAPÍTULO II

"Desarrollo y validación de un método analítico por hplc para la cuantificación de acetazolamida y timolol. Aplicación del quality by design al diseño y desarrollo de una formulación de liposomas deformables"

INDICE CAPÍTULO II

INDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II

INDICE DE TABLAS CAPÍTULO II

1. INTRODUCCIÓN

Maleato de timolol (TM) es un antagonista no selectivo del receptor β-adrenérgico utilizado eficazmente en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, como ya se comentó en la Introducción general, presenta el inconveniente típico de la baja biodisponibilidad de los fármacos tópicos administrados por vía oftálmica, debido en parte a su elevada solubilidad en agua. En este sentido, algunos estudios han verificado un aumento de su lipofilia en presencia de un ambiente apropiado de contra-iones para mejorar su biodisponibilidad ocular una vez instilado en el ojo (Higashiyama et al., 2004). También se ha demostrado que TM administrado una vez al día en una formulación de goma gellan es al menos tan eficaz como la solución de TM administrada dos veces al día (Shedden et al., 2001), evitando también el drenaje del fármaco a través de la vía nasolacrimal, que puede causar efectos secundarios sistémicos respiratorios y cardiovasculares (Everitt y Avorn, 1990; Wolfhagen et al., 1998). Sin embargo, esta formulación en forma de gel puede causar efectos adversos oculares en algunos pacientes (Shedden et al., 2001; Baklayan et al., 2008). Algunas de las estrategias que se han implantado en terapéutica pasan por terapias combinadas, buscando un efecto sinérgico. En esta línea, estudiamos en el presente trabajo la adición de acetazolamida (ACZ), continuando investigaciones iniciadas por otros autores (Becker, 1954; Coakes y Brubaker, 1978; Kass, 1983).

Convencionalmente, cuando se añade ACZ oral a un régimen de administración tópica de TM, se reduce la PIO, generando una reducción media de la presión de salida del 64,1% (Calissendorff et al., 1980; Dailey et al., 1982; Kass et al., 1982). Este potente inhibidor de la anhidrasa carbónica es eficaz en el control de la secreción de fluidos y en el tratamiento de la reducción de la PIO en pacientes que sufren glaucoma (Aggarwal et al., 2007). Sin embargo, ACZ administrada por vía oral tiene un uso limitado en esta patología debido a los efectos secundarios sistémicos asociados a su uso. Actualmente se utiliza oralmente porque no existe una formulación tópica disponible en el mercado ya que, como han demostrado algunos autores, muestra poco efecto sobre la PIO en conejos tras su administración tópica (Kaur et al., 2000). Las razones principales de ello son la baja solubilidad de este fármaco en el líquido lagrimal acuoso (0,7 mg/mL) y su limitada penetración corneal (log P = 0,3) (Kaur et al., 2002; Singla et al.,

2002). Además, la degradación de ACZ se incrementa considerablemente en condiciones alcalinas. El pH de máxima estabilidad es alrededor de 4,5 (Aggarwal et al., 2007). Teniendo en cuenta que la sal de sodio de este fármaco, que es muy soluble en agua, genera un pH > 9 en medio acuoso, este hecho dificulta la formulación de este fármaco a un pH adecuado para fines oftálmicos.

Los sistemas vesiculares derivados de los liposomas constituyen una herramienta potencial interesante como sistemas portadores. Pueden usarse adecuadamente para minimizar la absorción sistémica y mejorar la biodisponibilidad ocular (Kaur et al., 2004; Aggarwal y Kaur, 2005). El empleo de estos sistemas ha sido ampliamente investigado por nuestro grupo de investigación para mejorar la biodisponibilidad ocular, incrementar la solubilidad de los fármacos y aumentar la estabilidad de las moléculas (López-Pinto et al., 2005; Maestrelli et al., 2006; González-Rodríguez et al., 2007; Mura et al., 2007; Maestrelli et al., 2010). Así mismo, los sistemas modificados se pueden combinar con potenciadores de permeación (tales como etanol) para aumentar la capacidad de penetración del fármaco a través de la membrana corneal favoreciendo la accesibilidad del fármaco al humor acuoso (Kaur y Smitha, 2002; Aggarwal y Kaur, 2005; González-Rodríguez et al., 2007).

La revisión bibliográfica realizada revela que existen diversos métodos para la estimación de TM en fluidos biológicos, establecidos a través de diferentes métodos cromatográficos (Kulkarni y Amin, 2000; Nasir et al., 2011). Por otra parte, hay pocos métodos publicados para efectuar el análisis simultáneo de TM y otros fármacos antiglaucomatosos, como por ejemplo dorzolamida (Sharma et al., 2012; Mohamed et al., 2014). Además, la mayoría de los métodos analíticos encontrados en la literatura para determinar ACZ están dirigidos a cuantificar la sustancia individual en formulaciones farmacéuticas y muestras de orina por HPLC (Herráez-Hernández et al., 1992). Sin embargo, no se describe la determinación simultánea para cuantificar ACZ y TM en estas formulaciones.

Un proceso de validación bien definido y documentado no sólo satisface los requisitos de cumplimiento normativo, sino que también proporciona la evidencia de que el sistema y el método son adecuados para su uso previsto, y ayuda en su transferencia. En 1987, la *Food and Drug Administration* (FDA) designó por vez primera las especificaciones de validación que figuran en la

actual edición de la Farmacopea americana (USP 39, 2016). En la actualidad, la *International Conference on Harmonisation* (ICH) proporciona con más detalle y armoniza la inclusión y/o definición de algunos términos, lo que resulta útil para minimizar las diferencias entre los requisitos reglamentarios globales (ICH Q2 R1, 2005).

Como es bien sabido, el desarrollo y validación de un método analítico adecuado requiere el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la adecuada selección de la metodología analítica y la definición de las condiciones óptimas que garanticen los resultados obtenidos (Hund et al., 2000; Vander-Heyden et al., 2001; Nethercote y Ermer, 2013). En este contexto, la metodología Taguchi ha sido ampliamente aplicada al diseño de procesos farmacéuticos. Este enfoque constituye una estrategia que implica el uso de herramientas matemáticas y estadísticas para obtener la máxima información a través de los datos experimentales y encontrar las condiciones óptimas para la ejecución de un determinado proceso experimental. En el presente trabajo, se han utilizado tres herramientas específicas: las matrices ortogonales, la relación señal-ruido (S/N) y el análisis de varianza (ANOVA) (Jahanshahi et al., 2008). Además, el método de Taguchi se utiliza para maximizar la robustez de los productos y procesos, logrando así una alta calidad a bajo coste y tiempo.

El desarrollo y validación del método analítico constituyen asimismo herramientas potenciales para aplicar la Calidad por Diseño (QbD), necesaria para obtener una formulación optimizada, conocer los atributos críticos de calidad, parámetros críticos del proceso y espacio de diseño donde la formulación es segura y efectiva. Se define QbD como un mecanismo de control holístico y sistemático para el desarrollo farmacéutico, diseñando y desarrollando formulaciones y procesos de elaboración robustos que aseguren que nuestro medicamento sea seguro y eficaz (Lionberger et al., 2008). El QbD farmacéutico enfatiza que el seguimiento de la calidad del producto debe ser aplicado durante todo el proceso hasta la obtención del producto final (Lawrence, 2008). Esto requiere que los métodos científicos de mejora de la calidad se utilicen en las etapas iniciales de las fases de investigación, desarrollo y diseño (Wu et al., 2007). QbD identifica características que son críticas para la calidad desde la perspectiva de los pacientes, las traduce en los atributos que debe poseer el medicamento y establece cómo los parámetros críticos del proceso pueden ser variados para producir consistentemente un producto farmacológico con las características

deseadas (Lawrence, 2008). Un estudio QbD completo generalmente involucra las cinco etapas siguientes: (1) definir el perfil objetivo de calidad del producto basado en el conocimiento científico previo y la relevancia apropiada *in vivo*, (2) diseñar productos y procesos de fabricación para satisfacer el perfil predefinido, (3) identificar los atributos críticos de calidad, los parámetros del proceso y las fuentes de variabilidad (evaluación del riesgo), (4) utilizar un enfoque de diseño de experimentos (DOE) para detectar y obtener superficies de respuesta variables para establecer el espacio de diseño del producto (el rango de procesos y/o parámetros de formulación que se han demostrado para proporcionar garantía de calidad), y (5) controlar los procesos de fabricación para producir un producto de calidad consistente en el tiempo a través del funcionamiento dentro del espacio de diseño establecido, asegurando así que la calidad está incorporada en el producto (ICH Q8 R2). Para ello, se utilizaron dos diseños experimentales.

En el presente estudio, se abordó un diseño de selección Plackett-Burman (Lewis et al., 1998) con el fin de identificar los factores más significativos que afectaron a nuestras formulaciones en términos de encapsulación del fármaco, tamaño vesicular y potencial zeta. A continuación, se evaluaron dos lotes para optimizar sus variables de respuesta y obtener una formulación adecuada para la administración oftálmica.

2. OBJETIVOS

En este Capítulo se han planteado dos objetivos principales:

1. Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de ACZ y TM en liposomas deformables, describiendo los parámetros de validación, bajo las pautas ICH, para lograr un método analítico con características aceptables de idoneidad y viabilidad.

2. Aplicar el QbD para obtener una formulación optimizada en su espacio de diseño, siguiendo las pautas de la ICH Q8, para diseñar, elaborar y caracterizar liposomas deformables de ACZ y TM, con el fin de proveer un sistema de liberación que, por sus características, resulte adecuado para su administración oftálmica. Previamente, se han desarrollado unos ensayos de preformulación con el fin de dilucidar las características de los fármacos en estudio. Para dar cumplimiento a este objetivo general, se llevaron a cabo los siguientes objetivos parciales:

2.1 Análisis de los métodos de elaboración de los liposomas y elección del método que proporcione mejores resultados en cuanto a eficacia de encapsulación, tamaño vesicular, índice de polidispersión y potencial zeta;

2.2 Evaluación de la influencia de la ubicación de los principios activos en los compartimentos del liposoma sobre la eficacia de encapsulación, teniendo en cuenta para ello las características fisicoquímicas de los fármacos, así como la evaluación de la influencia del método de elaboración empleado y la estructura del liposoma sobre la permeación y la liberación de los principios activos desde el interior del liposoma, estableciendo el mecanismo de liberación de los fármacos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS

ACZ y TM fueron adquiridos de Acofarma (Barcelona, España). Acetonitrilo (ACN) calidad HPLC, ácido acético glacial, cloroformo, metanol, ácido 4- (2-hidroxietil) -1 piperazinoetanosulfónico (Hepes), hidróxido sódico y peróxido de hidrógeno 33% (v/v) fueron proporcionados por Panreac Chemistry (Barcelona, España). El cloruro sódico, la gelatina, el laurilsulfato sódico se adquirieron de Acofarma (Barcelona, España). El acetato de sodio trihidrato y nitrato de sodio se recibieron de VWR (Leuven, Bélgica). El colesterol (CH), desoxicolato sódico (Deo-Na), etanol (EtOH) y fosfatidilcolina (PC) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). El agua desionizada y purificada, usando un sistema Milli-Q (Millipore), se seleccionó como disolvente para la preparación de soluciones estándar. Todos los demás reactivos utilizados en este estudio fueron de calidad analítica.

3.2. ANÁLISIS TÉRMICO

El análisis térmico comprende el estudio de la evolución de las propiedades de una muestra cuando es sometida a altas temperaturas. En este grupo de técnicas que miden las propiedades físicas de una sustancia en función de la temperatura sometiendo a las muestras a un programa de temperatura controlado se incluyen la microscopía de platina caliente (HSM) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los métodos térmicos se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica para valorar la pureza de las

muestras de fármacos y detectar posibles incompatibilidades fármaco-excipiente.

3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta técnica está destinada a detectar transiciones endotérmicas y exotérmicas, como la determinación de temperaturas de transformación y la entalpía de sólidos y líquidos en función de la temperatura. En este ensayo, tanto la muestra como la referencia se mantienen a la misma temperatura y se miden las diferencias entre la cantidad de calor aportado a una sustancia y su referencia en función de la temperatura de la muestra cuando ambas están sometidas a un programa de temperatura controlado (Skoog et al., 2001). Como consecuencia del desarrollo, se pueden generar procesos endotérmicos como fusión, transición de fase, transición vítrea, evaporación, etc.; o exotérmicos, cuando se produce cristalización, descomposición, oxidación, polimerización, etc. (Clas et al., 1999). Mediante los termogramas obtenidos, es posible caracterizar el comportamiento térmico de la materia. Los picos generados son el resultado tanto de cambios físicos como de reacciones químicas inducidas por los cambios de temperatura en la muestra. Las áreas de dichos picos en los termogramas dependen fundamentalmente de la masa de la muestra y de la entalpía del proceso que haya tenido lugar.

En este estudio, se analizaron por DSC (131 *Setaram*) los componentes lipídicos constituyentes de las vesículas (PC, CH y Deo-Na), ACZ, TM así como las mezclas físicas binarias fármaco-componente lipídico. Además, se realizó un estudio de una formulación de liposomas deformables que contenían etanol. Las muestras, con un peso comprendido entre 5 y 8 mg se incorporaron en un portamuestras de aluminio perforado en la parte superior. Dichas muestras fueron sometidas a calentamiento a una velocidad de 10 °C/min, en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 400 °C. Cabe destacar que las mezclas físicas binarias se prepararon en proporción 1:1, al ser ésta la más apropiada para detectar una posible interacción física o química entre los componentes.

3.2.2. Microscopía de platina caliente (HSM)

Esta técnica, basada en las propiedades ópticas, permite la observación de cambios morfológicos y estructurales en función de la temperatura. Así, la visualización de un parámetro característico de la sustancia a una

determinada temperatura conduce a la identificación y caracterización de la misma (Wiedemann y Casagrande, 1998).

La observación microscópica del proceso de fusión de las muestras se realizó mediante una platina caliente (*Mettler FP82 HT*), acoplada a un microscopio *Olympus BH-2* (objetivo 10x) con un dispositivo de registro fotográfico digital. La regulación de la velocidad de calentamiento se realizó mediante una unidad de control (*Mettler FP80 HT*). La temperatura inicial y final de programación fue variable dependiendo de las características de la muestra. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min.

El estudio se aplicó solamente a las mezclas binarias que habían mostrado una posible interacción en el estudio previo realizado por DSC. Para la preparación de la muestra, se colocó una pequeña cantidad de muestra entre un portaobjetos y un cubreobjetos, introduciéndose ambos en la platina. Posteriormente, se sometió el sistema a un ciclo de temperaturas previamente establecido.

3.3. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS DEFORMABLES

La composición base de los transfersomas se recoge en la Tabla 1:

Fase oleosa (F_o)		**Fase acuosa (F_a)**
PC	95,4 µmoles	Tampón Hepes pH 7,4 Etanol 1,5% v/v
CH	81,2 µmoles	
Deo-Na	7,24 µmoles	

Tabla 1. Composición base de los liposomas deformables para 3 ml.

Las vesículas elásticas fueron elaboradas utilizando diferentes técnicas, que se describen a continuación.

3.3.1. Formación de MLVs: técnica de evaporación en capa fina (TLE)

Las vesículas MLVs resultaron tras la hidratación de una película de fosfolípidos, de manera similar a la mencionada en el Capítulo I y que queda resumida en la Figura 1. La dispersión resultante contiene vesículas que son heterogéneas en tamaño y laminaridad (Patil y Jadhav, 2014).

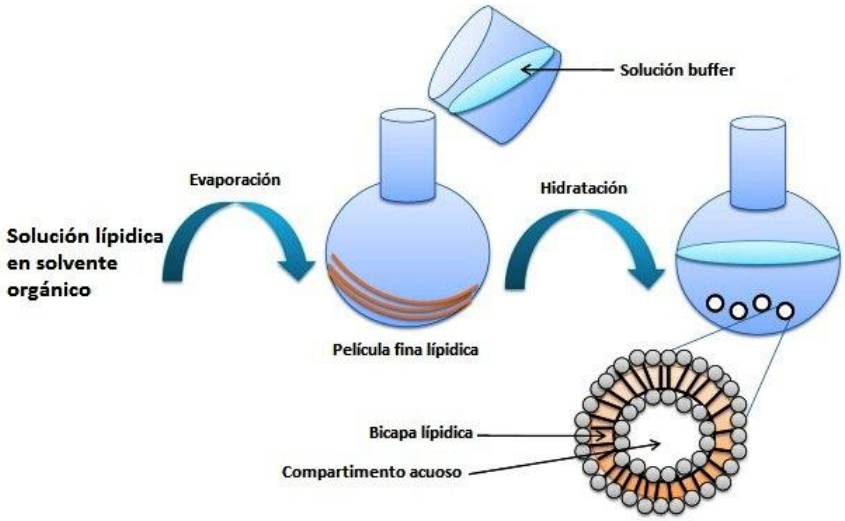


Figura 1. Representación esquemática de la técnica de evaporación en capa fina.

Brevemente, PC y CH se pesaron en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en 4,8 mL de cloroformo. Paralelamente, se preparó una solución que contenía el principio activo (ACZ o TM según lote) y Deo-Na en 3,2 mL de metanol. Tras la evaporación del disolvente, la película fina se hidrató con 3 mL de tampón Hepes pH 7,4 en el que se encontraba disuelto el otro principio activo (ACZ o TM, según lote), el cual contenía 1,5% v/v de etanol absoluto. Finalmente, se sometió la formulación a cinco ciclos de agitación de 1 minuto de *vórtex* intercalados con cinco minutos de calentamiento en un baño a 58 °C, hasta la obtención de una dispersión coloidal homogénea de color blanco.

3.3.1.1. Extrusión

Durante la fase de optimización, en algunas formulaciones, las vesículas multilaminares obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito se sometieron, además, a un proceso de extrusión secuencial con el fin de reducir el tamaño de las vesículas y obtener poblaciones más homogéneas y unilaminares de las mismas. El proceso, al igual que en el desarrollado en el Capítulo I, se llevó a cabo utilizando un extrusor (*LIPEXTM Thermobarrel Extruder*) con nitrógeno para aplicar una presión moderada (100 a 800 psi), forzando así el paso de las vesículas a través de los filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. La presión utilizada fue de 600 psi y se usaron

filtros de policarbonato de 0,8 µm y 0,4 µm, a través de los cuales se pasó la muestra 5 veces por cada uno.

3.3.1.2. Sonicación

La sonicación es el método más extendido para la preparación de vesículas unilaminares pequeñas (SUVs). En este método, las vesículas multilaminares obtenidas mediante TLE se sonicaron durante 20 minutos, a 100 W y una temperatura de 58 °C. Richardson et al. (2007) sugirieron que el mecanismo de reducción del tamaño de los liposomas por ondas de ultrasonido era debido a un alargamiento mediado por cizallamiento y la posterior ruptura de los liposomas, causada por una microtransmisión alrededor de las burbujas, y no como resultado del colapso de burbujas cavitadas. El estudio concluyó que el aumento de la potencia de sonicación daba como resultado liposomas más pequeños. Otros autores han demostrado que la reducción del tamaño de los liposomas por sonicación es función de la frecuencia del ultrasonido sugiriendo que las ondas de baja frecuencia conducen a oscilaciones de mayor amplitud que son las responsables de la formación de liposomas más pequeños (Yamaguchi et al., 2009).

3.3.1.3. Método de congelación-descongelación (FAT, frozen and thawed multilamellar vesicles)

Esta técnica consiste en someter una dispersión de liposomas MLVs preformada a ciclos de congelación durante 30 segundos (en nitrógeno líquido) y descongelación (agua caliente) en un baño a una temperatura de 58 °C durante 30 segundos. Este proceso se repite nueve veces (Rongen et al., 1997). Durante la etapa de congelación, la bicapa lipídica seca o deshidratada entra en contacto con el fármaco a encapsular. Posteriormente, al descongelar la muestra, las posibilidades para atrapar las moléculas son mucho mayores.

3.3.2. Formación de LUVs: Evaporación en fase reversa (REV)

Similar al método TLE, esta técnica también implica la hidratación de fosfolípidos disueltos en una fase por adición de agua con mezcla vigorosa. En contraste con el método anterior, en este caso se forma una emulsión A/O y la evaporación de la fase orgánica da como resultado una dispersión en este caso en la que los liposomas son principalmente unilaminares (LUV) aunque algunas vesículas pueden poseer bicapas concéntricas (MLV) (Patil y Jadhav, 2014).

El procedimiento de evaporación en fase reversa consta de seis fases, que se recogen en la Figura 2.

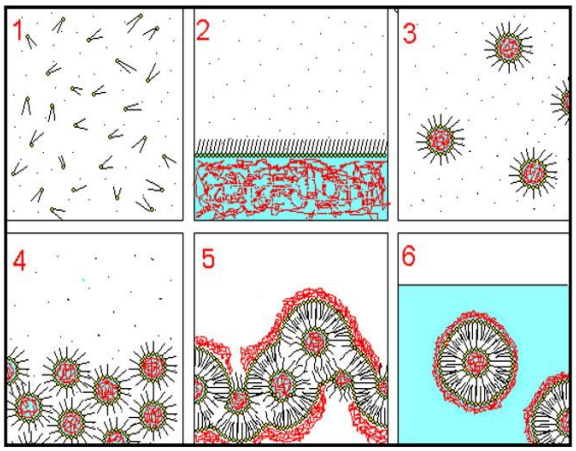


Figura 2. Representación esquemática de la técnica de evaporación en fase reversa.

En primer lugar (fase 1), los componentes lipídicos de la formulación se pesan directamente en un matraz de fondo redondo y se disuelven en 9 mL de una mezcla dietiléter-metanol (8:1). La adición del metanol tiene como finalidad garantizar la disolución del principio activo. A esta solución se adicionaron 3 mL de tampón Hepes en la que se ha disuelto previamente uno de los fármacos (ACZ o TM según lote, fase 2).

La mezcla se sometió a un proceso de sonicación utilizando un baño de ultrasonidos hasta obtener una emulsión de color blanco y de aspecto lechoso, correspondiente a la formación de micelas invertidas (Fase 3). Seguidamente, se eliminó el solvente orgánico con ayuda de un rotavapor (Fase 4) y se observó la formación del gel (Fase 5), el cual posteriormente colapsa, formando la dispersión de liposomas (Fase 6). Finalmente, esta dispersión se sometió a un ciclo de vórtex durante 5 minutos con el fin de separar y homogeneizar las vesículas en el espacio acuoso.

Todas las formulaciones elaboradas por las distintas técnicas fueron almacenadas en el frigorífico a una temperatura de 4 °C.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES

3.4.1. Análisis morfológico de los sistemas vesiculares

3.4.1.1. Microscopía óptica (MO)

Las muestras de los liposomas obtenidos por las diferentes técnicas de elaboración se observaron utilizando un microscopio óptico *Olympus BH-2*. La muestra diluida en Hepes se observó con los objetivos de 10x y 40x. Este análisis es importante para comprobar la formación de las vesículas. Además, es posible verificar la estabilidad física por ausencia de cristales del fármaco en la formulación. Las imágenes se han obtenido mediante la adaptación de una cámara al microscopio.

3.4.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Este tipo de microscopio utiliza como fuente un haz de electrones dirigido hacia el objeto que se quiere visualizar. Permite alcanzar una capacidad de aumento muy superior a la microscopía óptica fundamentalmente debido a que la longitud de los electrones es mucho menor que la de los fotones de luz, proporcionando una mayor resolución, y mostrando así estructuras mucho más pequeñas que un microscopio óptico. La observación de la muestra comienza con la emisión del haz de electrones dirigido hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra.

El estudio morfológico de las muestras se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (*Philips CM-10*) con las siguientes especificaciones técnicas:

- Tensión de trabajo: hasta 100 kV (40, 60, 80, 100).
- Sistema de adquisición digital de imágenes (Cámara EMCCD de 4 Mpx).
- Tamaño mínimo de spot: 200 nm.
- Resolución máxima: 4,2 Å.

El procedimiento se inició con la deposición de una gota de la formulación diluida con tampón Hepes pH 7,4 en una rejilla de cobre de 300 mesh y expuesta a temperatura ambiente durante 30 minutos para su fijación por

evaporación del medio acuoso. Posteriormente, se realizó la tinción de las vesículas con acetato de uranilo 2% p/v, una sal densa a los electrones. En todos los casos se utilizó el filamento de tungsteno para la emisión electrónica y la corriente de aceleración del sistema se fijó en 40 kV. Se realizaron microfotografías de las dispersiones de liposomas elaboradas mediante las diferentes técnicas de elaboración, con el fin de estudiar la influencia de la técnica de elaboración sobre la morfología y el tamaño de las vesículas.

3.4.2. Análisis dimensional y carga superficial

El tamaño y el índice de polidispersión (IP) de las vesículas se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (*Dynamic light scattering, DLS*) utilizando el equipo Zetasizer Nano-S a temperatura ambiente (*Malvern Instruments*, Malvern, UK). La interpretación de los datos se basa en que valores de IP inferiores a 0,2 indican poblaciones homogéneas y monodispersas mientras que IP mayores (> 0,3) indican heterogeneidad.

El potencial zeta se determinó a partir de mediciones de movilidad electroforética (μ). La movilidad μ se convirtió a potencial zeta por la ecuación de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon$$

donde η es la viscosidad y ε es la permitividad de la solución.

Las formulaciones de liposomas deformables se diluyeron 1:20 v/v en agua MilliQ® y se midieron a una temperatura de 25 °C, por triplicado. Los resultados se presentaron como media ± DE.

3.4.3. Determinación del porcentaje de encapsulación (PdE)

La cuantificación de ACZ y TM encapsulados en los liposomas deformables se llevó a cabo tras la extracción de los mismos mediante un proceso de centrifugación que ha sido descrito previamente en el Capítulo I, apartado 3.3.5. (González-Rodríguez et al., 2016).

3.4.4. Estudios de permeación *in vitro*

Los estudios de permeación se han realizado en celdas de difusión de Franz (área de difusión de 3,14 cm^2) utilizando una membrana de celulosa (Whatman®) previamente impregnada con una solución de gelatina y saturada con la fase receptora (FR) durante 30 minutos para simular las condiciones de la córnea. Las membranas se montaron entre el compartimento donador y receptor. Este último se completó con 14 mL de solución tampón Hepes a pH 7,4 y se mantuvo a 37 °C bajo agitación continua (*SES-Gmgh Analyse systemes*, Alemania). La preparación se colocó en el compartimento donador en condiciones no oclusivas y el estudio de permeación continuó durante 24 h. Se recogieron alícuotas de 1 mL a intervalos predeterminados hasta alcanzar las 24 h, de acuerdo con las directrices internacionales, reemplazando el mismo volumen con FR y manteniendo una temperatura constante. La concentración de activos se determinó por HPLC y los datos obtenidos se procesaron con el software G-STAT 2.0.

Los parámetros de permeabilidad ACZ y TM se calcularon representando la cantidad de fármaco permeado a través de la membrana (mg/cm^2) en función del tiempo (min), usando la parte lineal de las curvas (fase inicial). El flujo de estado estacionario J se determinó a partir de la siguiente relación (Attama et al., 2008):

$$J = \frac{\delta Q}{A \delta t}$$

donde Q indica la cantidad de fármaco cuantificado, A es el área de difusión, t es el tiempo de exposición. El coeficiente de permeabilidad P en cada caso se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$P = \frac{J}{C_0}$$

donde C_0 es la concentración inicial de fármaco en el medio donador.

Para determinar la significación estadística de los datos, se utilizó la prueba t de Student al 95% de confianza estadística. Para dilucidar matemáticamente el hecho de que los flujos producidos en las diferentes formulaciones ocasionaban perfiles de permeación similares o distintos del fármaco a partir de las diferentes muestras, se realizó una comparación estadística de los perfiles de permeación del fármaco con la solución del mismo. Para ello, se

determinó el factor de similitud (f_2), un indicador de la diferencia promedio entre el perfil de referencia y el de prueba. El f_2 se usa comúnmente para la comparación de los perfiles de disolución. Sin embargo, en nuestro caso nos puede dar información de la comparación de los perfiles de permeación de los liposomas deformables. El cálculo de este parámetro se realizó aplicando la siguiente expresión matemática:

$$f_2 = 50.\log\left[\frac{1}{\sqrt{1+\frac{\sum_{t=1}^{n}(\%R_t - \%T_t)^2}{n}}}\cdot 100\right]$$

donde *n* es el número de puntos experimentales, R_t es el porcentaje de fármaco procedente de la formulación control liberado a un tiempo *t* y T_t es el porcentaje de fármaco procedente de la formulación problema liberado a un tiempo *t*. Para efectuar un tratamiento válido, se consideran los tiempos hasta el siguiente punto correspondiente al 85% de fármaco liberado.

Este ensayo se llevó a cabo en lotes de liposomas utilizando como control una solución acuosa de cada uno de los fármacos. En algunas formulaciones, las muestras de liposomas deformables depositadas en el compartimento donador se formularon en un gel de Carbopol® al 0,5% p/v, para dar consistencia y aumentar el tiempo de permanencia en la córnea (1,1 mL de liposomas deformables en gel de Carbopol®).

3.4.5. Estudios de liberación in vitro

Para determinar la liberación de los fármacos se ha empleado el método de diálisis en membrana, ampliamente utilizada por numerosos autores. El proceso se llevó a cabo utilizando membranas de acetato de celulosa (*Spectra/por membrana MWCO: 12-14.000, Spectrum Laboratories, EE.UU.*) con un diámetro de 20,4 mm.

Previamente, se procedió a la hidratación de la membrana en tampón Hepes pH 7,4 ± 0,1 durante 1 hora. Posteriormente, la membrana hidratada se cerró herméticamente quedando en su interior 1 mL de la muestra de liposomas objeto de análisis. Este sistema se introdujo en un vaso de precipitado que contenía 50 mL de lágrimas artificiales ($NaHCO_3$ 0,218% p/p, NaCl 0,678% p/p, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 0,0084% p/p, KCl 0,138% p/p), sometiéndose a

agitación magnética en placa térmica a una temperatura de 37 °C. A determinados tiempos se retiraron alícuotas de 1 mL, por duplicado, reponiendo el mismo volumen con el fin de mantener constantes las condiciones de volumen durante el ensayo. Cada alícuota retirada se filtró y se determinó por HPLC el contenido liberado de ambos fármacos en cada una de ellas. El ensayo de liberación se llevó a cabo en lotes de liposomas teniendo como control soluciones acuosas de cada uno de los fármacos.

A continuación, se representó gráficamente el porcentaje liberado de cada principio activo frente al tiempo. Posteriormente, se realizó el ajuste cinético de los resultados. Los modelos matemáticos aplicados fueron los siguientes (Costa y Sousa, 2001):

- Cinética de orden cero: establece la existencia de una relación lineal entre la fracción liberada y el tiempo, según la ecuación:

  $$Q = K_0 \cdot t$$

  Donde Q es la cantidad de fármaco liberado; K_0 es la constante de velocidad de orden cero y t el tiempo de liberación.

- Cinética de primer orden: la liberación depende directamente de la concentración del fármaco.

  $$Ln\ Q = Ln\ Q_0 - K_1 \cdot t$$

  Donde Q_0 es la cantidad inicial de fármaco; K_1 es la constante de velocidad de orden uno y t el tiempo de liberación.

- Método de Higuchi: en el que la cantidad de fármaco liberado es una función lineal de la raíz cuadrada del tiempo.

  $$Q = K_H \cdot t_{1/2}$$

  Donde Q es la cantidad de fármaco liberado; K_H es la constante de velocidad de Higuchi y t el tiempo de liberación.

3.5. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

3.5.1. Sistema cromatográfico y condiciones

El equipo cromatográfico utilizado (Hitachi LaChrom *HPLC System Manager*) se compone de cuatro unidades: L-7100 bomba isocrática, inyector automático de muestras L-7200, detector DAD L-7455 de longitud de onda

variable e interfase D-7000. El sistema cromatográfico está constituido por una columna de acero inoxidable (Merck, *LiChrospher 100 RP-18*) de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro, empaquetada con microesferas de sílice unidas a partículas de octadecilsilano de 5 µm de diámetro.

La cuantificación de los principios activos se realizó a la longitud de onda para la que se observa la respuesta media tanto para ACZ como para TM, ya que se propone una detección conjunta en un solo cromatograma. La longitud de onda seleccionada fue 286 nm. La fase móvil consistió en tampón acetato sódico trihidrato 0,05 M (Ace-Na) ajustado a pH 4,1 con ácido acético glacial y acetonitrilo (ACN) grado HPLC, en el sistema de gradiente mostrado en la Tabla 2.

	Tiempo	% ACN	% Ac-Na	Flujo (mL/min)
	0	10	90	1.5
ACZ	2.2	10	90	1.5
	2.3	40	60	2.0
	4.0	40	60	2.0
TM	4.1	10	90	2.0
	5.0	10	90	2.0

Tabla 2. Condiciones cromatográficas en gradiente desarrolladas para analizar ACZ y TM en liposomas deformables.

Con estas condiciones, se aseguró una separación adecuada entre los picos de ACZ y TM y las diversas interferencias que pudieron aparecer en el sistema.

3.5.2. Parámetros de validación

Este método fue validado bajo la normativa de la ICH (Q2R1 2005), basada en la metodología propuesta por la AEFI. Los parámetros evaluados han sido exhaustivamente descritos en trabajos previos (Cózar-Bernal et al., 2013).

3.5.2.1. Idoneidad del sistema

La idoneidad del sistema se ha validado inyectando seis repeticiones de una solución estándar de TM y ACZ (0,5 mg/mL de cada uno) evaluándose la precisión en términos de desviación estándar relativa (coeficiente de variación, CV) del área del pico, así como los parámetros cromatográficos, el tiempo de retención, el número de platos teóricos, factor de capacidad, factor de selectividad y la resolución. Para calcular el tiempo muerto se utilizó una solución de $NaNO_3$ 0,05 M.

3.5.2.2. Selectividad

El estudio de selectividad del método se realizó desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo. Las muestras preparadas fueron solución estándar de TM y ACZ (0,5 mg/mL cada uno en Hepes 10 mM a pH 7,4), liposomas deformables sin fármaco y liposomas deformables que incluían TM y ACZ.

La selectividad cualitativa se evaluó comparando los tiempos de retención entre liposomas deformables sin fármaco y la solución estándar, y su pureza espectral, para analizar una posible superposición o interferencia con los constituyentes de la formulación.

La selectividad cuantitativa se determinó aplicando la comparación de las medias de las áreas entre el estándar y los liposomas deformables con los fármacos usando el test de Student-Fisher. Éste compara dos medias de grupos independientes, puesto que se supone que no hay relación entre la solución estándar y los liposomas cargados porque proceden de un tratamiento diferente. Antes de aplicarlo, fue necesario realizar la prueba de homogeneidad de varianzas de F-Snedecor y asegurar que los datos presentaban una distribución normal. Para ello, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para tamaños de muestra inferior a 30.

- ***Pruebas de normalidad de Shapiro – Wilks***

Para contrastar la normalidad de un conjunto de datos cuando se trata de muestras pequeñas (n < 30), se calcula la media y la varianza de las muestras (S^2) ordenándose las observaciones de menor a mayor. A continuación, se calculan las diferencias entre el primero y el último; el segundo y el penúltimo; el tercero y el antepenúltimo, etc. y se corrigen con unos coeficientes tabulados por Shapiro y Wilks. El estadístico de prueba es:

$$w = \left(\frac{D^2}{nS^2}\right)$$

donde D es la suma de las diferencias corregidas.

Se rechazará la hipótesis nula de normalidad si el estadístico w es menor que el valor crítico proporcionado por la tabla elaborada por los autores para el tamaño de la muestra y el nivel de significación dado (Álvarez, 2007b, 2007c).

- ***Prueba de homogeneidad de varianzas F-Snedecor***

Determina el intervalo de confianza del cociente poblacional de dos varianzas y un contraste de hipótesis de dos varianzas. La expresión para calcular el % de IC (1 - α) para el cociente de varianzas es:

$$IC\ 95\% \left(\frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}\right) = \left(\frac{s_1^2 / s_2^2}{F_{1-\alpha/2;gln;gld}} ; \frac{s_1^2}{s_2^2} F_{1-\alpha/2;gln;gld} \right)$$

Siendo s_1^2 y s_2^2 las varianzas de las muestras para cada grupo, donde $F_{1-\alpha/2;gln;gld}$ se calcula a partir de una F-Snedecor siendo gln los grados de libertad del numerador, que se calculan como el tamaño de la muestra del grupo con mayor varianza muestral menos uno, y gld los grados de libertad del denominador que se calculan como el tamaño de la muestra del grupo con menor varianza muestral menos uno.

Bajo la hipótesis nula sigue una distribución F-Snedecor. En el caso de no poder rechazar la hipótesis nula (p-valor > 0.05) se considera que las dos varianzas son iguales (homogéneas) (Desu y Raghavarao, 2004).

- ***Prueba de t-Student-Fisher: comparación de dos medias***

Todas las pruebas paramétricas, en las cuales se incluye la t-Student y la F-Fischer, se basan en supuestos teóricos. Dichos supuestos matemáticos las hacen válidas, pues al analizar las mediciones de las observaciones, se tienen procedimientos de gran potencia-eficiencia para evitar error del tipo I. En tales pruebas paramétricas, se exige una serie de requisitos para aplicarlas como instrumento estadístico:

- Las observaciones deben ser independientes.
- Las observaciones se deben efectuar en universos poblacionales distribuidos normalmente.
- Las mediciones se deben elaborar en una escala de intervalo, entendiendo que una escala de intervalo exige que puedan efectuarse todas las operaciones aritméticas admisibles. También se requiere que los intervalos entre las mediciones tengan la misma magnitud.

- Las varianzas de los grupos deben ser homogéneas, por lo que se aplica la prueba de normalidad de varianzas de Shapiro-Wilks.

El modelo matemático que se presenta, corresponde a dos muestras independientes (Box et al., 2008).

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_c \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

donde t es el valor estadístico de la prueba *t de Student;* $\bar{X}_1$ *el* valor promedio del grupo 1; $\bar{X}_2$ el valor promedio del grupo 2; σ_c la desviación estándar ponderada de ambos grupos; y N el tamaño de la muestra 1 y 2.

La ecuación para obtener la desviación estándar ponderada es:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{SC_1 + SC_2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

Donde σ_p es la desviación estándar ponderada; *SC* la suma de cuadrados de cada grupo; y N el tamaño de la muestra 1 y 2.

- Hipótesis alternativa (H_1). Las dos muestras son distintas.
- Hipótesis nula (H_o). Las dos muestras no son distintas.

El valor de *t* experimental se compara con los valores críticos de la tabla (*t-Student*). También se aplica el valor de la mayor probabilidad p-valor, de manera que si éste es menor al nivel de significación α (0,05), se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa (Álvarez, 2007a).

Así, una vez verificada la selectividad cualitativa, se realizó el estudio cuantitativo, que consistió en inyectar nueve réplicas de solución estándar y liposomas cargados, para calcular sus áreas de pico respectivas y determinar su porcentaje de discrepancia según la fórmula:

$$\%\ Discrepancia = \frac{(D_i - D_s) \cdot 100}{D_S}$$

donde D_i es respuesta media con interferencias y D_s es respuesta media sin interferencias.

Posteriormente, se realizó la confrontación estadística de los resultados aplicando para ello las pruebas estadísticas citadas anteriormente y para determinar el valor de *t-Student-Fisher* se utilizó el software G-Stat 2.0.

- ***Estudios de degradación forzada***

Para los estudios de degradación, las soluciones estándar de ambos fármacos se sometieron a diferentes grados de estrés siguiendo las pautas de la ICH. Este estudio de degradación forzada se realizó exponiendo el principio activo a las condiciones descritas a continuación.

Para analizar el efecto del pH, las soluciones estándar de ACZ y TM (0,5 mg/mL) se expusieron a soluciones de HCl 1N o NaOH 1N durante 24 h. La degradación oxidativa se estudió mediante la exposición de las soluciones estándar a H_2O_2 (3% v/v). El efecto de la exposición a la luz se evaluó mediante la exposición de varios frascos que contenían solución patrón de fármaco a la luz solar o luz UV (254 nm) durante 24 h. Para comprobar el efecto de la temperatura y la degradación del fármaco por ultrasonido, las muestras se mantuvieron durante 1 h en un baño termostatizado de ultrasonidos a 60,0 ± 0,5 °C. Después del período de ensayo, las muestras se analizaron por HPLC.

3.5.2.3. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para responder proporcionalmente a los cambios en la concentración o cantidad del analito en la muestra. El estudio de linealidad verifica que las soluciones de la muestra están en un intervalo de concentración donde la respuesta es linealmente proporcional a la concentración de este analito. Para el desarrollo de este ensayo, se evaluó la linealidad del sistema y del método.

Para verificar la linealidad del sistema, se utilizaron soluciones estándar, mientras que para la linealidad del método, se valoraron liposomas cargados con los fármacos. Se estableció el siguiente rango de concentración: 50, 75, 100, 125 y 150% de la dosis (0,5 mg/mL).

La homogeneidad de la varianza se verificó aplicando el test de Cochran, indicando si el factor de concentración ejerce alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para ello, el valor experimental de G (G_{exp}) se calculó mediante la siguiente expresión:

$$G_{exp} = \left(\frac{Var_{max}}{\sum_1^k Var}\right)$$

Donde Var_{max} es la varianza máxima y Var es el valor de varianza para cada concentración. La homogeneidad de la varianza se demuestra si el valor de G_{exp} es menor que el valor tabulado de G_{tab}. En este estudio, el valor tabulado G_{tab} (p = 0,05; n = 3; K = 5) es igual a 0,6838. Si se demuestra la homogeneidad de la varianza, se procede a calcular la línea de regresión para la misma concentración y áreas corregidas por el método de los mínimos cuadrados. En caso de que la homogeneidad de la varianza no se ajuste, se debe investigar el rango de datos que satisfagan este parámetro. Las áreas obtenidas para cada concentración se representan frente a la concentración.

Además, se realizó la prueba de proporcionalidad aplicando el test de Student, que indica que la intercepción no es significativamente diferente de cero. En el presente estudio, el valor experimental de Student-t (t_{exp}) para TM y ACZ ha de ser menor que 2,16, que es el valor tabulado de Student-t (t_{tab}) para p = 0,05 y 14 grados totales de libertad.

Finalmente, se estudió la prueba de la pendiente. La función de respuesta para un procedimiento analítico es la relación existente, dentro de un intervalo específico, entre la respuesta (área) y la concentración del analito en la muestra. Para cada nivel de concentración, el factor de respuesta se calculará de la siguiente manera:

$$f = \frac{Area}{Concentración}$$

Se procedió a obtener el factor respuesta para cada área, y se calculó su coeficiente de variación:

$$\mathrm{CV} = \frac{\mathrm{Sf}}{\mathrm{f}} \cdot 100$$

donde Sf corresponde a la desviación estándar del factor de respuesta y f es el valor promedio del factor de respuesta.

En una calibración lineal, los factores respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Valores del coeficiente de variación superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendados valores no superiores al 2%.

Además, se analizó la desviación estándar de la pendiente. Esta prueba trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba t de Student:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

donde S_b se obtiene a partir de la varianza residual. La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0,05. A su vez, se calculan los intervalos de confianza a partir de la siguiente expresión:

$$b \pm t \cdot S_b$$

siendo t el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y con un α = 0,05.

3.5.2.4. Precisión

La precisión de un método analítico se define como el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales de los análisis repetidos de una muestra homogénea. La precisión proporciona cierta información sobre los errores aleatorios y puede dividirse en repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad se calculó a partir de inyecciones múltiples de solución estándar de TM y ACZ inyectadas 10 veces calculándose la desviación estándar relativa (%).

La precisión intermedia consiste en determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra de liposomas con fármaco en un mismo laboratorio, pero en condiciones operativas diferentes y fue realizada según el diseño experimental recogido en la Tabla 3.

Días	Analistas	Muestra	Inyecciones
1, 2	Analista 1	1	1
			2
			3
		2	1
			2
			3
		3	1
			2
			3
1, 2	Analista 2	1	1
			2
			3
		2	1
			2
			3
		3	1
			2
			3

Tabla 3. Diseño experimental para llevar a cabo la precisión intermedia.

3.5.2.5. Exactitud

La exactitud se puede definir como el grado de concordancia entre el valor encontrado y el valor aceptado. La exactitud del método analítico se evaluó analizando cinco niveles de concentración (50, 75, 100, 125 y 150% de la dosis, 0,5 mg/mL) de liposomas que incluían el fármaco. Para ello se empleó la técnica del porcentaje de recuperación, siendo los criterios de aceptación entre el 97-103% del valor esperado. Se prepararon soluciones de muestras de liposomas deformables de ACZ y TM por triplicado. Los analitos se cuantificaron en cada muestra utilizando el método analítico desarrollado y se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de Cochran para asegurar la igualdad de varianzas por grupos y demostrar que la concentración del factor no afectó la variabilidad de los resultados. El G_{exp} se compara con el G_{tab}; siendo $G_{exp} < G_{tab}$, se verifica que las varianzas de las concentraciones son equivalentes.

3.5.2.6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) es definido por la USP como la concentración más baja de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Por su parte, el límite de cuantificación (LOQ) es la

concentración más baja en una muestra que puede ser medida dentro de un nivel aceptable de precisión y exactitud, en las condiciones experimentales seleccionadas. LOD se define para un pico que da una relación señal-ruido de, aproximadamente, 3:1, mientras que LOQ se define para un pico que da una relación señal-ruido de aproximadamente 10:1.

La estimación del valor LOD se determinó mediante el método de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, aplicando la siguiente fórmula, calculándose su desviación estándar relativa, que no debería ser superior al 10%:

$$\mathrm{LOD} = \frac{3.3\,\sigma}{S'}$$

donde σ se corresponde a la desviación estándar de la respuesta obtenida a partir de la tabla ANOVA de la regresión, y S' es el valor de la pendiente de la ecuación de regresión.

El intervalo seleccionado fue el comprendido entre el 1-25% del valor de la dosis (0,5 mg/mL). Con el valor generado aplicando la ecuación anterior, se verificó el LOD mediante la inyección múltiple de esta concentración y se evaluó que el porcentaje de la desviación estándar relativa no superase el 17%.

La determinación del LOQ mediante la siguiente ecuación se llevó a cabo aplicando la misma metodología del LOD, y la solución patrón más diluida con una respuesta lineal se consideró el LOQ; se comprobó el valor teórico, inyectando seis veces una solución preparada a dicha concentración, calculándose su desviación estándar relativa, que no debería ser superior al 5%.

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10\,\sigma}{S'}$$

3.5.2.7. Robustez

La robustez de cualquier procedimiento analítico según la ICH es "una medida de la capacidad del método para no verse afectado por pequeños cambios o variaciones deliberadas, y proporciona una indicación de su aptitud durante el uso normal". Este parámetro analítico se evaluó variando algunos parámetros cromatográficos dentro de un rango real, y se determinó su influencia cuantitativa en las variables de respuesta. Para ello, se ha utilizado un diseño factorial fraccional para analizar múltiples factores que

minimizan el coste económico y el tiempo. El diseño seleccionado fue Taguchi, utilizado en ensayos anteriores, que permite el análisis de un gran número de parámetros de diseño utilizando sólo un número limitado de experimentos. Típicamente, los factores se eligieron simétricamente en torno a un valor central, formando un intervalo que excede ligeramente las variaciones que se pudiesen esperar cuando se implemente el método (Taguchi, 1986; Krier et al., 2011). La Tabla 4 ilustra el estudio del diseño factorial para seis factores planteado.

FACTOR	-1	0	+1
Flujo (mL/min)	1.9	2	2.1
Temperatura horno (°C)	43	45	47
pH tampón	3.9	4.1	4.3
ACN en fase móvil (%)	38	40	42
Volumen de inyección (µL)	9	10	11
Longitud de onda (nm)	284	286	288

Tabla 4. Factores y sus niveles incluidos en el diseño ortogonal Taguchi L_{27}.

Una vez seleccionados los factores y sus niveles, se determinó la matriz experimental utilizando el programa estadístico DOEpack® 2000. En la Tabla 5 se recoge la matriz ortogonal desarrollada con 27 experimentos. Las respuestas a evaluar fueron el tiempo de retención y el área de pico cromatográfico correspondiente a la solución patrón de fármaco. Los datos cromatográficos generados se analizaron en base a la prueba ANOVA y otros estudios estadísticos como las medias marginales de los factores. El objetivo de este estudio fue también demostrar que el diseño de Taguchi fue un diseño adecuado para pruebas de robustez, ya que esta metodología constituye un enfoque sistemático para estudiar los efectos de múltiples factores. En este trabajo se han aplicado el método de Taguchi para el diseño de experimentos, relación señal/ruido (relación S/N), análisis de medias (ANOM) y análisis de varianza (ANOVA) para lograr los objetivos previstos. A partir de este estudio, se extraerán los factores críticos.

Exp.	Flujo (mL/min)	T (°C)	pH	ACN (%)	Volumen de inyección (µL)	λ (nm)
1	1,9	43	3,9	38	9	284
2	1,9	43	4,1	40	10	286
3	1,9	43	4,3	42	11	288
4	1,9	45	3,9	40	10	288
5	1,9	45	4,1	42	11	284
6	1,9	45	4,3	38	9	286
7	1,9	47	3,9	42	11	286
8	1,9	47	4,1	38	9	288
9	1,9	47	4,3	40	10	284
10	2	43	3,9	40	11	286
11	2	43	4,1	42	9	288
12	2	43	4,3	38	10	284
13	2	45	3,9	42	9	284
14	2	45	4,1	38	10	286
15	2	45	4,3	40	11	288
16	2	47	3,9	38	10	288
17	2	47	4,1	40	11	284
18	2	47	4,3	42	9	286
19	2,1	43	3,9	42	10	288
20	2,1	43	4,1	38	11	284
21	2,1	43	4,3	40	9	286
22	2,1	45	3,9	38	11	286
23	2,1	45	4,1	40	9	288
24	2,1	45	4,3	42	10	284
25	2,1	47	3,9	40	9	284
26	2,1	47	4,1	42	10	286
27	2,1	47	4,3	38	11	288

Tabla 5. Matriz experimental modelo de Taguchi L_{27} para ensayo de robustez.

3.5.3. Composición de la formulación de liposomas utilizada para la validación

Los liposomas deformables se prepararon mediante la técnica TLE descrita en este capítulo en el apartado 3.3.1. La composición en la bicapa fue PC, CH, TM (0,5mg/mL) y Deo-Na; y la incorporación de ACZ (0,5mg/mL) en la fase acuosa.

3.6. ESTUDIO DE LA CALIDAD POR DISEÑO (QbD)

Esta herramienta estadística se aplicó en el presente proyecto con el fin de obtener información necesaria para conseguir una formulación optimizada que resulte adecuada para su administración oftálmica conociendo los atributos críticos de calidad, parámetros críticos del proceso y espacio de diseño donde la formulación es segura y efectiva.

El estudio QbD se dividió básicamente en dos fases:

1ª) Fase de cribado de factores que influyeron significativamente en las tres variables de respuesta analizadas (tamaño vesicular, PZ y PdE) aplicando un diseño experimental (modelo experimental de Plackett-Burman).

2ª) Optimización de la formulación mediante la prueba t de Student para muestras independientes que son las variables de respuesta: PdE, tamaño de partícula, PZ y cinética de permeación.

3.6.1. Estudio de Plackett-Burman

Este estudio se aplicó para evaluar qué variables del proceso y formulación influyeron estadísticamente en las variables de respuesta elegidas (PdE (%), PZ (mV) y tamaño vesicular (nm)). Los factores y sus niveles se muestran en la Tabla 6.

Factor		Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)	Unidad	Continua
Cantidad de PC	**A**	95,4	104,98	µmol	Sí
Cantidad de CH	**B**	81,2	89,33	µmol	Sí
Cantidad de Deo-Na	**C**	7,24	7,96	µmol	Sí
Etanol (v/v)	**D**	1,35	1,5	%	Sí
MeOH/Cl_3CH	**E**	0,67	0,73	Ratio	Sí
Proceso de hidratación	**F**	Dinámico	Estático	-	No
Tiempo de hidratación	**G**	30	42	Minutos	Sí
Extrusión	**H**	Sí	No	-	No

Tabla 6. Factores y niveles en el estudio de selección Plackett-Burman. Dinámico: aplicando 5 ciclos de vórtex en la fase de hidratación. Estático: Sin aplicar ciclos de vórtex en la fase de hidratación.

Se utilizó el software Centurion XVI STATGRAPHICS versión 16.1.17 para el desarrollo de la matriz ortogonal experimental Plackett-Burman (Tabla 7).

N°	A	B	C	D	E	F	G	H
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	+	+
5	-	-	-	+	+	+	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	+	+	-	+
8	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	+	-	-	-	+	+	+
10	-	-	+	+	+	-	+	+
11	-	+	+	+	-	+	+	-
12	+	-	+	+	-	+	-	-

Tabla 7. Matriz PB_{12} diseño de cribado de los factores en el estudio de QbD de la formulación.

Los datos se analizaron mediante ANOVA y se obtuvieron gráficos de Pareto y diagramas de efectos principales para conocer qué factores afectan estadísticamente a las variables de respuesta, información que se utilizará para establecer un espacio de diseño y una mejor optimización de la formulación (Ardakani y Wulff, 2013).

3.6.2. Optimización

Los parámetros críticos del proceso fueron identificados estableciendo un espacio de diseño para ellos. Debido a la naturaleza estadística de los resultados, no pudo aplicarse como una metodología para optimizar, la superficie de respuesta. Por lo tanto, se prepararon y evaluaron dos lotes para optimizar sus variables de respuesta (atributos críticos de calidad). Dichos atributos críticos de calidad fueron PdE, PZ, tamaño vesicular y perfil de permeación, los cuales se compararon estadísticamente con la prueba t de Student.

Los perfiles de permeación se compararon utilizando el factor de similitud propuesto por la FDA. Utilizando los valores medios de disolución de ambas curvas en cada intervalo de tiempo se calculó el factor de similitud (f2) cuya expresión matemática quedó recogida en el apartado 3.4.4. del presente capítulo. Este método modelo independiente es más conveniente para

comparar perfiles de disolución o permeación, cuando hay tres o cuatro puntos temporales disponibles (Shah y Yacobi, 1990; Moller y Siewert, 1995). Por lo tanto, se determinó el perfil de disolución de las dos formulaciones. Para que las curvas se consideren similares, el valor de f2 debe ser cercano a 100. Generalmente, los valores f2 superiores a 50 (50-100) garantizan la igualdad o la equivalencia de las dos curvas y, por lo tanto, el rendimiento de los productos (Shah et al., 1992a; 1992b). Posteriormente, se seleccionó la formulación con las mejores características, por lo que la formulación optimizada se estableció bajo el enfoque racional del diseño experimental y QbD (Amidon et al., 1995; Moore, 1996; Ahad et al., 2013).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN

4.1.1. Influencia de carga del fármaco y la técnica de elaboración

En una primera aproximación y en base a la solubilidad del TM, que se estudió en el Capítulo I de la presente memoria, se decidió incorporar ACZ en la fase oleosa de los liposomas debido a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación que mostraron la dificultad para incorporarla en los compartimentos acuosos de los liposomas multilaminares a causa de su escasa solubilidad acuosa.

Así, la cantidad máxima de ACZ añadida en la bicapa se estableció a partir de los resultados derivados de la elaboración de cinco lotes a los cuales se le añadieron cantidades crecientes (0,186/0,500/0,667/0,834/1 mg/mL) del fármaco en cuestión. Los lotes se elaboraron mediante la técnica TLE. Los resultados (Figura 3) reflejan un PdE cercano al 30% de los lotes con un rango de concentración entre 0,5-0,834 mg/mL. Sin embargo, al observar las muestras al microscopio, en los lotes con una concentración superior a 0,667 mg/mL había fenómenos de cristalización, mostrando a simple vista una separación entre ambas fases al dejar la dispersión en reposo. Así, se escogió la formulación que contiene 0,5 mg/mL de ACZ como la de mejor eficacia de encapsulación y mayor estabilidad física.

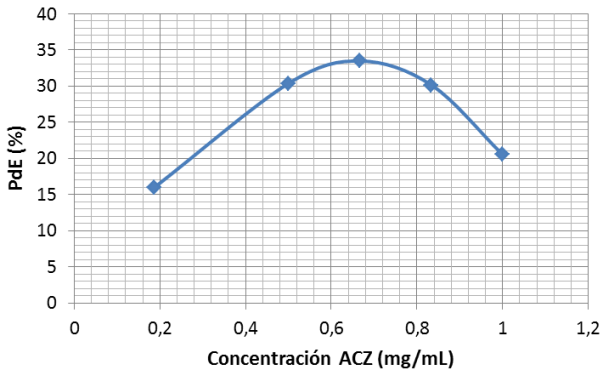


Figura 3. Porcentaje de encapsulación (%) obtenido en los lotes formulados con distintas concentraciones de ACZ.

Posteriormente, se incorporó TM en el compartimento acuoso de los liposomas aprovechando su solubilidad en este medio. Para tal fin, se tuvo

en cuenta el dato empírico de solubilidad en Hepes calculado anteriormente (2,83 mg/mL), junto con la cantidad de ACZ previamente encapsulada (0,5 mg/mL). Se elaboraron igualmente mediante la técnica TLE cuatro lotes con concentraciones de 0,5/1/1,5/2 mg/mL. Los resultados mostraron que la eficacia de encapsulación tiende a disminuir al aumentar la cantidad de TM incorporada en el liposoma (Figura 4). Por tal razón, se puede concluir que el lote constituido por 0,5 mg/mL de ACZ y TM presentó el mejor porcentaje de encapsulación de los fármacos y, a su vez, mayor estabilidad física.

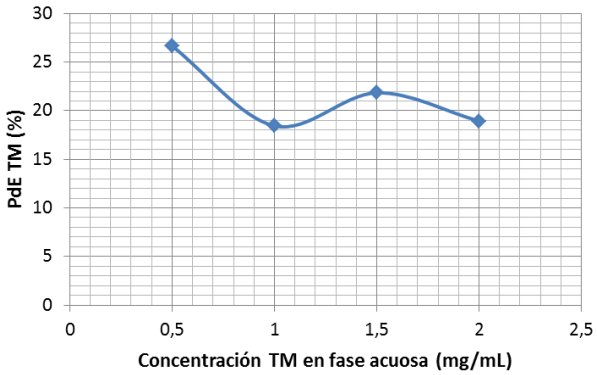


Figura 4. Porcentaje de encapsulación (%) de TM obtenido en los lotes formulados con 0,5 mg/mL de ACZ y diferentes concentraciones de TM.

Una vez establecida la composición cuali y cuantitativa de la formulación, se procedió a modificar la técnica de elaboración (TLE, REV, FAT y sonicación) con el fin de determinar posteriormente la técnica que ofreciera el mejor porcentaje de atrapamiento de los fármacos.

La Figura 5 recoge los resultados obtenidos del estudio, mostrando que las formulaciones elaboradas por la técnica TLE presentaron la mayor eficacia de encapsulación de ambos principios activos, atribuible a la mayor afinidad de los mismos por la bicapa lipídica y el compartimento acuoso de las vesículas. En este sentido, ACZ, al ser muy poco soluble en agua y en los fluidos lagrimales, se incorpora fácilmente en las numerosas bicapas de estas vesículas; por el contrario, TM, por su elevada solubilidad en agua, permanece en los espacios acuosos de la vesícula. De esta manera, este tipo de liposomas proporciona un balance en la eficacia de encapsulación de fármacos con una solubilidad opuesta. Estos resultados se encuentran en concordancia con un estudio realizado por otros investigadores (Guinedi et al., 2005), en el que compararon el método REV y TLE para la preparación de

niosomas de ACZ, presentando un mayor PdE las vesículas MLV debido a su capacidad de encapsular fármacos hidrófobos en la bicapa lipídica.

A pesar de ser TM una molécula hidrófila, y esperar que su PdE aumentase al utilizar el método REV debido a las vesículas unilaminares típicas que se obtienen mediante esta técnica, las cuales presentan un pequeño espacio lipídico y gran espacio acuoso, estas formulaciones presentaron baja eficacia de encapsulación al compararlas con las otras técnicas (Figura 5).

Respecto a las vesículas obtenidas por sonicación (SUV), éstas exhibieron bajas eficacias de encapsulación de los principios activos, lo cual se pudo atribuir a la presencia de un compartimento interno con volumen reducido, propio de sus dimensiones. Así, el tamaño de este tipo de vesículas es el principal factor responsable de la eficacia de encapsulación de los fármacos (Maestrelli et al., 2009). Por su parte, las vesículas FAT presentaron resultados de encapsulación favorables para TM, debido fundamentalmente a que las vesículas MLV sometidas a ciclos de congelación y descongelación muestran desestabilización de la bicapa lipídica. Este fenómeno genera una ruptura de las láminas de las vesículas y, por tanto, un aumento de la eficacia de encapsulación por incremento del volumen acuoso (Mayer et al., 1985; Castile y Taylor, 1999). Por el contrario, la eficacia de encapsulación de ACZ disminuye en las vesículas FAT, lo cual se puede explicar por la precipitación del fármaco durante el ciclo de congelación (Maestrelli et al., 2006), hecho evidenciado en las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (ver apartado 4.1.4.).

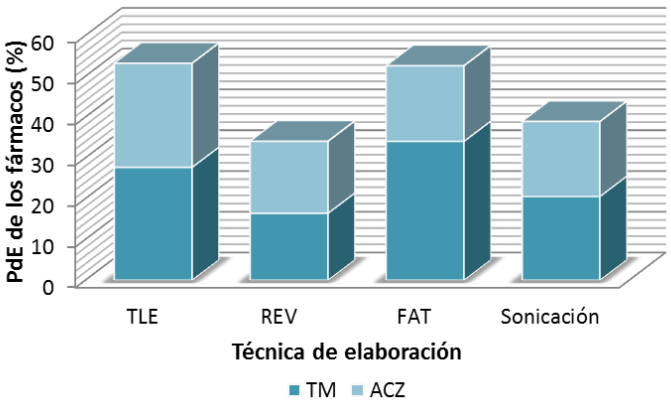


Figura 5. PdE (%) de los liposomas deformables elaborados por las diferentes técnicas.

Tal y como afirman otros autores (Pisal et al., 2014), el trabajo actual enfatiza el hecho de que las técnicas utilizadas para la carga de fármaco en liposomas influyen notablemente en el rendimiento de la formulación final.

4.1.2. Ubicación del fármaco en la vesícula lipídica

Vistos los datos de atrapamiento de los fármacos, con este estudio se planteó simular el comportamiento que presentaban los éstos en la columna cromatográfica de HPLC. De la columna eluye, en primer lugar, ACZ por su afinidad por la fase móvil. A continuación lo hace TM, por su afinidad con la fase estacionaria con grupos apolares C18. Este comportamiento podría explicarse atendiendo al parámetro log P o coeficiente de reparto, el cual es indicativo de la afinidad de una molécula por un medio oleoso respecto a un medio acuoso. Según datos bibliográficos, TM posee un valor de log P de 1,83, lo que indica una mayor afinidad por fases oleosas. Por el contrario, ACZ presenta una mayor afinidad por las fases acuosas al poseer un valor de log P de -0,26 (Hansch et al., 1995). Cabe destacar que TM se presenta en forma de maleato por lo cual su solubilidad se encuentra favorecida al estar en forma de sal.

De esta manera y con estas observaciones, se planteó incluir ACZ en la fase acuosa, en presencia de un cosolvente para mejorar su solubilidad, y TM en la fase oleosa. De entre los cosolventes más comúnmente empleados (Romero y Lozano, 2012), en este estudio, se utilizó etanol para mejorar la solubilidad de ACZ en el compartimento acuoso de los liposomas, ya que reduce la polaridad del agua por un proceso de debilitamiento de sus puentes de hidrógeno, que resulta en un incremento de la solubilidad de fármacos no polares en la mezcla agua-cosolvente (Millard et al., 2002; Sanghvi et al., 2008). La proporción de etanol que se seleccionó para la preparación de los transfersomas fue del 1,5%, ya que esta formulación está destinada para una administración oftálmica y, por consiguiente, no debe superar dicha proporción.

Con estas premisas, se elaboraron dos lotes de liposomas deformables, en los cuales se cambió la ubicación de los fármacos en los compartimentos del liposoma, por las diferentes técnicas y se llevó a cabo la caracterización física de los mismos para evaluar la influencia de la ubicación del fármaco sobre este parámetro. En la formulación 1, TM se incorporó en la fase acuosa y la

ACZ en la fase oleosa; y en la formulación 2, se intercambió la ubicación de los fármacos.

Los resultados de PdE obtenidos para las diferentes formulaciones se recogen en la Figura 6 y su análisis estadístico se describe en la Tabla 8. Se observa que no existe diferencia significativa en el PdE de ACZ en los liposomas elaborados por el método de sonicación, es decir, el PdE es independiente si el fármaco se ubica en la fase oleosa o acuosa. De la misma manera sucedió con el TM encapsulado con el método REV, ya que se evidencia que los grupos son homogéneos. Estos resultados se verificaron con la aplicación del test ANOVA (Método Tukey HSD al 95%) con el fin de comparar los PdE de los fármacos en las formulaciones 1 y 2, mostrando la homogeneidad de ambas formulaciones cuando se elaboraron con el método de sonicación y en fase reversa para ACZ y TM, respectivamente. Los resultados quedan plasmados en la tabla 8 para ambos fármacos.

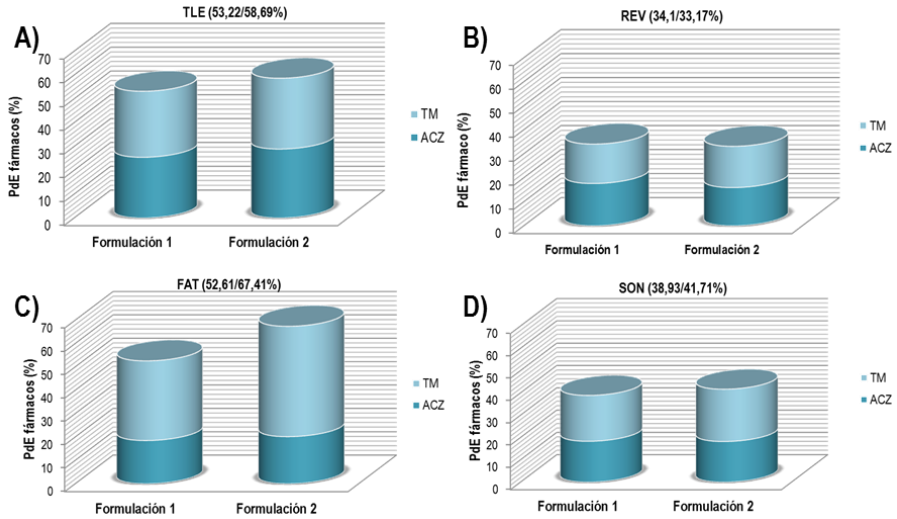


Figura 6. Resultados del PdE para Formulación 1 y 2 por las distintas técnicas de elaboración.

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples
Número de Casos: 24
Método: Tukey HSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
REV F2	3	15.9600	X
REV F1	3	17.6600	X
SON F2	3	18.2600	X
SON F1	3	18.3700	X
FAT F1	3	18.5300	X
FAT F2	3	20.1900	X
TLE F1	3	25.5200	X
TLE F2	3	28.9700	X

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples
Número de Casos: 24
Método: Tukey HSD al 95%

	N	Media	Grupos Homogéneos
REV F1	3	16.4400	X
REV F2	3	17.2100	X
SON F1	3	20.5600	X
SON F2	3	23.4500	X
TLE F1	3	27.7000	X
TLE F2	3	29.7200	X
FAT F1	3	34.0800	X
FAT F2	3	47.2200	X

Tabla 8. Resultados del test ANOVA que compara el PdE de ACZ (izquierda) y TM (derecha) de las formulaciones 1 y 2 elaboradas por los diferentes métodos.

Se observó que el PdE de TM se vio favorecido al encontrarse en el compartimento lipídico de las vesículas FAT. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, en las formulaciones FAT se evidencian cristales cuando se observan al microscopio, por lo cual este método de elaboración fue descartado por la escasa estabilidad física del fármaco. Por tanto, se confirmó la TLE como la técnica de elaboración más adecuada.

De ellas, por tanto, la formulación 2 (ACZ en la fase acuosa y TM en la oleosa) mostró mejores valores de PdE para ambos principios activos. Además, esta formulación proporcionó suficiente estabilidad física y una alta reproducibilidad inter-lote.

4.1.3. Análisis dimensional y PZ

Una vez seleccionada la formulación 2, ésta se preparó por las distintas técnicas de elaboración detalladas en el apartado de Metodología, siendo analizada posteriormente en términos de PZ, análisis dimensional y morfológico. Los liposomas deformables preparados por las técnicas TLE, REV, FAT y sonicación presentaron valores negativos de PZ comprendidos entre -34,77 ± 1,75 mV y -38,17 ± 0,59 mV, como se refleja en la Tabla 9. Como cabría esperar, la carga negativa de las vesículas fue debida a la presencia de desoxicolato sódico en la formulación, activador del borde que,

a pH 7,4, se encuentra mayoritariamente en su forma ionizada, contribuyendo sus aniones colato al aporte de la carga superficial de las vesículas (Chen et al., 2009).

Por otra parte, el tamaño de las vesículas mostró una gran dependencia con el método de preparación, como ya ha sido demostrado por otros autores (Maestrelli et al., 2006). Así, las vesículas FAT y REV presentaron mayor tamaño vesicular comparado con el resto de formulaciones. Estudios previos han demostrado que el diámetro medio de las vesículas multilaminares aumenta significativamente tras someter la muestra a ciclos sucesivos de congelación-descongelación, debido a la desestabilización que sufren las bicapas durante el proceso, que da lugar a la transformación de vesículas multilaminares en vesículas unilaminares grandes (Castile y Taylor, 1999).

En cuanto al IP, las formulaciones elaboradas por los métodos REV y FAT mostraron los valores más altos de este parámetro, que se traduce en la heterogeneidad de las muestras en cuanto al tamaño. En el caso de las vesículas FAT, como se ha mencionado en otros apartados de esta memoria, los ciclos de congelación-descongelación generan una ruptura de la bicapa lipídica, formándose nuevos liposomas con poblaciones heterogéneas de vesículas. Por el contrario, las vesículas elaboradas por la técnica TLE poseen un tamaño vesicular pequeño y de población homogénea, tal como indica su IP. Estos resultados están en concordancia con el estudio realizado por Maestrelli et al. (2009).

Técnica de elaboración	Tamaño de Vesícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Zeta (mV)
TLE	440,4 ± 4,8	0,47 ± 0,03	-38,17 ± 0,59
REV	831,6 ± 36,1	0,66 ± 0,09	-34,77 ± 1,75
SON	319,5 ± 9,2	0,45 ± 0,09	-37,03 ± 0,86
FAT	832,1 ± 46,7	0,77 ± 0,11	-35,70 ± 0,61

Tabla 9. Caracterización física de la formulación 2 elaborada por las diferentes técnicas.

4.1.4. Análisis morfológico: Microscopía óptica (MO) y Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el fin de analizar la influencia del método de elaboración sobre la morfología de las vesículas, se realizaron microfotografías por TEM de los lotes elaborados por todas las técnicas.

Algunas imágenes representativas de las formulaciones elaboradas (Figura 7) muestran vesículas esféricas formadas por el método TLE (Figura 7A) mientras que en la ilustración 7B llama la atención la presencia de cristales de fármaco, de un tamaño aproximado de 200 nm en la formulación FAT.

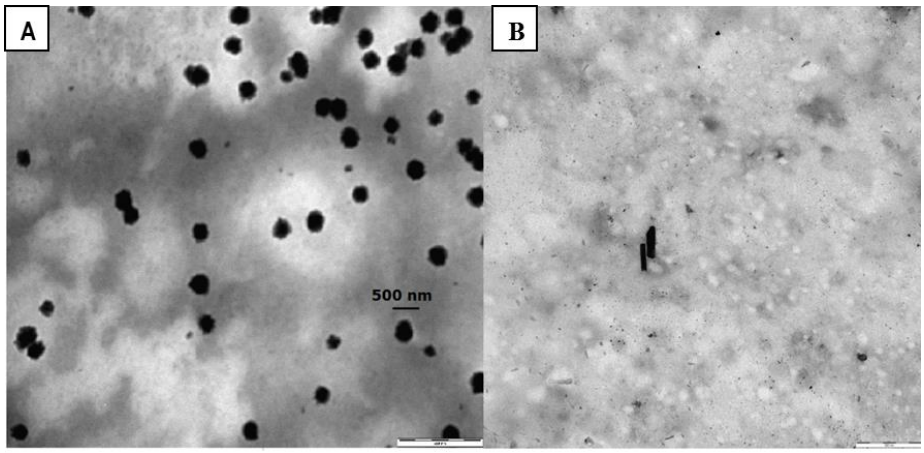


Figura 7. Microfotografías de las formulaciones de transfersomas de ACZ y TM elaborados por A) TLE y B) FAT.

4.1.5. Análisis térmico

El objetivo de este análisis fue, por un lado, detectar posibles incompatibilidades entre los componentes lipídicos que conforman las vesículas (PC, CH y Deo-Na) y entre fármaco-componente lipídico mediante DSC; y por otro, aplicar HSM a las mezclas binarias que dieron como resultado en el estudio de DSC una posible interacción para observar si se producen cambios morfológicos y estructurales. La Figura 8 recoge el termograma correspondiente a una muestra de ACZ, obtenido por DSC. En él se evidencia un pico correspondiente a la endoterma de fusión del fármaco a 268,7 °C con una entalpía de fusión de 162,8 J/g.

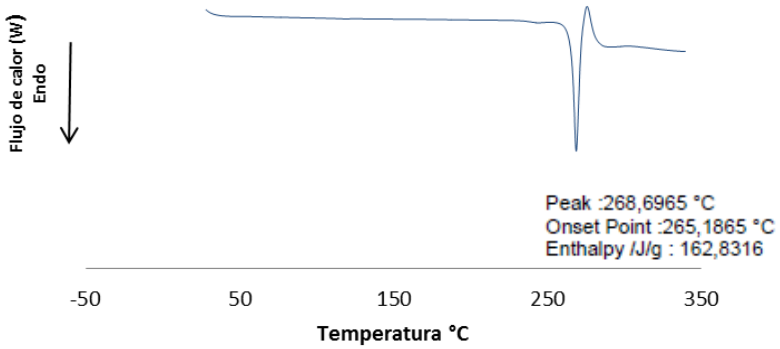


Figura 8. Termograma correspondiente a la muestra de ACZ.

Se utilizó como técnica complementaria la platina caliente con el fin de dilucidar los cambios que presentan las partículas de los principios activos cuando se incrementa la temperatura. En la Figura 9 se muestran las imágenes correspondientes a ACZ. A temperatura ambiente se observan los cristales de diferente tamaño en forma de agujas (Figura 9a). Cuando se aumenta la temperatura a 250 °C, los cristales disminuyen su tamaño y se redondean sus bordes (Figura 9b). Finamente, a 268 °C se alcanza el punto de fusión del compuesto, observándose vesículas de fundido en toda la muestra (Figura 9c).

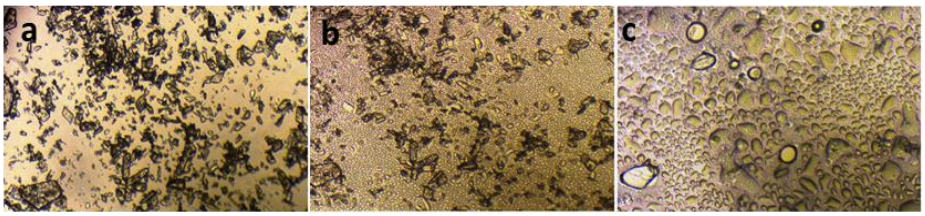


Figura 9. Secuencia de fotografías obtenidas por HSM de la ACZ: (a) 25 °C; (b) 250 °C; (c) 268 °C.

Asimismo, el termograma del TM muestra una endoterma de fusión a 202,6 °C con una entalpía de fusión de 70,4 J/g, seguido de una banda amplia, como consecuencia posiblemente de la degradación del fármaco (Figura 10). Estos resultados se corroboraron mediante la técnica complementaria. Así, en la Figura 11a se observan los cristales de TM a temperatura ambiente. Una vez se alcanza una temperatura de 199 °C las partículas empiezan a

fundir (Figura 11b) y a 204 °C el proceso de fusión se ha llevado a cabo casi por completo (Figura 11c).

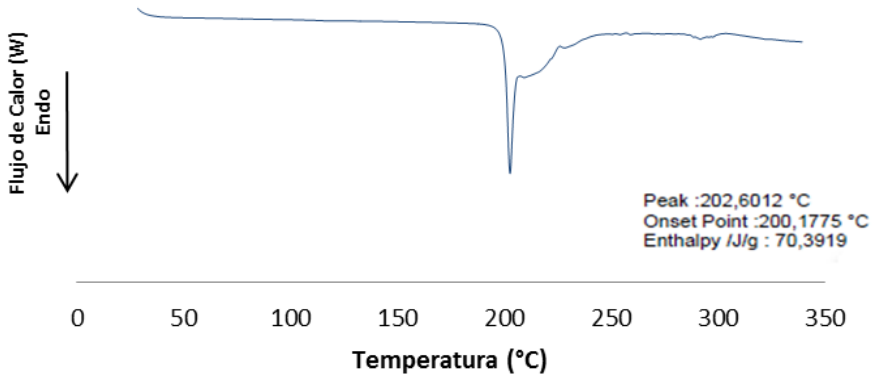


Figura 10. Termograma correspondiente a la muestra de TM.

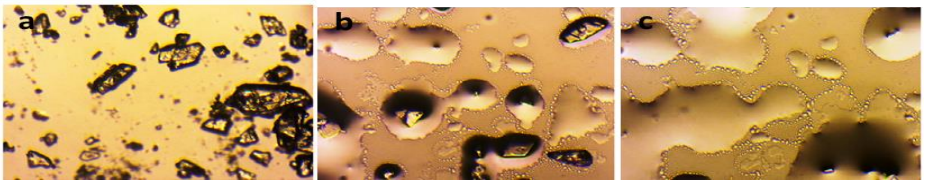


Figura 11. Secuencia de fotografías obtenidas por HSM del TM: (a) 25 °C; (b) 199 °C; (c) 204 °C.

Con el fin de dilucidar la existencia de algún tipo de incompatibilidad entre los principios activos y los componentes de las vesículas, se procedió a analizar mediante DSC mezclas binarias 1:1 de cada uno de los fármacos con Deo-Na, PC y CH.

En primer lugar, las mezclas físicas de los fármacos con el CH mostraron termogramas coincidentes con la superposición de los termogramas de los productos aislados (Figura 12 y 13), registrándose únicamente un leve desplazamiento en la temperatura del pico del fármaco, en el caso del TM (Figura 13). Estos resultados se pueden interpretar como una ausencia o inexistencia de interacción entre estos componentes.

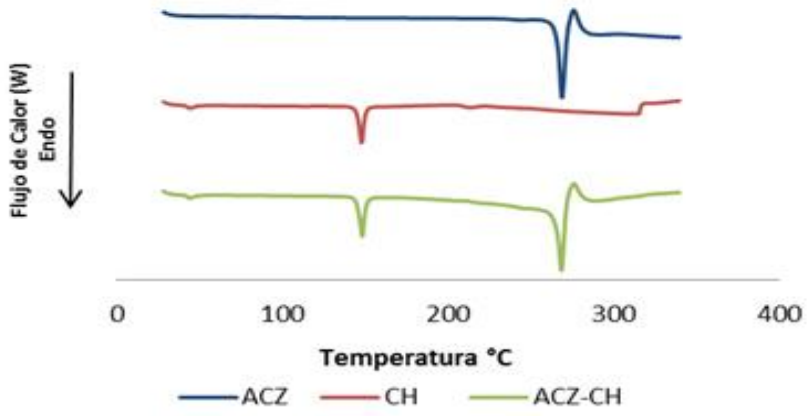


Figura 12. Termogramas correspondientes a acetazolamida (ACZ), colesterol (CH) y su mezcla física 1:1.

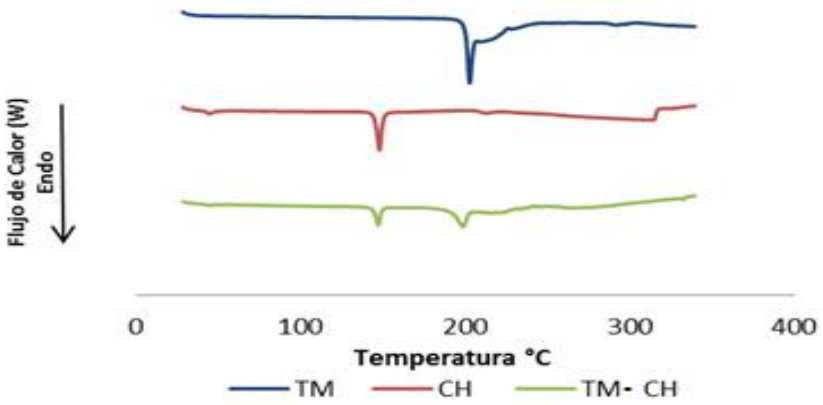


Figura 13. Termogramas correspondientes a timolol (TM), colesterol (CH) y su mezcla física 1:1.

Los termogramas de las mezclas de los principios activos con Deo-Na muestran una banda próxima a los 100 °C, la cual podría achacarse a un fenómeno de deshidratación del Deo-Na. Este hallazgo se confirmó por HSM mediante la adición de una gota de aceite y se observó la formación de burbujas de vapor de agua.

Por otra parte, la mezcla física ACZ/Deo-Na registró un desplazamiento en la temperatura del pico del fármaco (Figura 14). Por el contrario, tal como se muestra en la Figura 15, la mezcla del Deo-Na con TM se caracterizó por una

ausencia del pico endotérmico del fármaco, lo cual sugiere una interacción de los componentes. El análisis térmico muestra, por tanto, que el excipiente afecta al punto de fusión de los fármacos, posiblemente debido a una disolución parcial de los fármacos con el tensioactivo (Figuras 16 y 17).

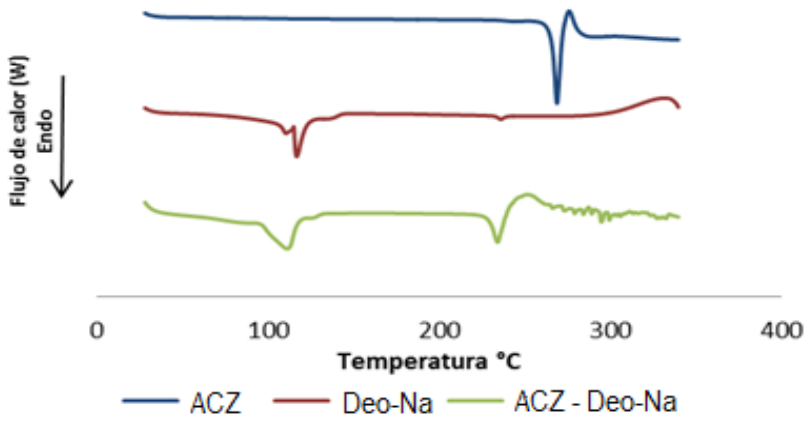


Figura 14. Termogramas correspondientes a acetazolamida (ACZ), desoxicolato sódico (Deo-Na) y su mezcla física 1:1.

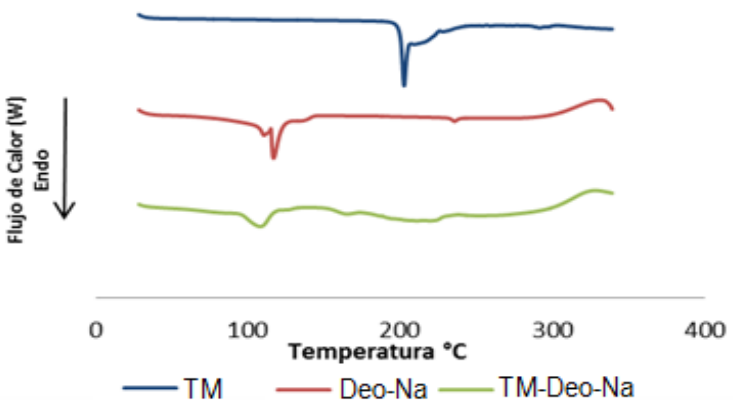


Figura 15. Termogramas correspondientes a timolol (TM), desoxicolato sódico (Deo-Na) y su mezcla física 1:1.

Este comportamiento puede explicarse por las propiedades fisicoquímicas propias del Deo-Na, ya que esta sustancia, una sal biliar, es un tensioactivo aniónico que puede solubilizar los principios activos (Monti et al., 2002).

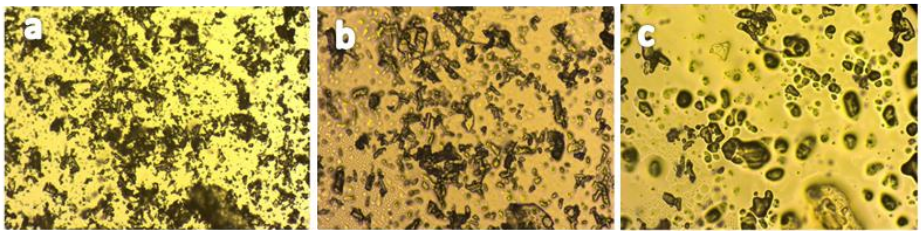


Figura 16. Secuencia de fotografías obtenidas por HSM de ACZ/DOC: (a) 112 °C; (b) 230 °C; (c) 241 °C.

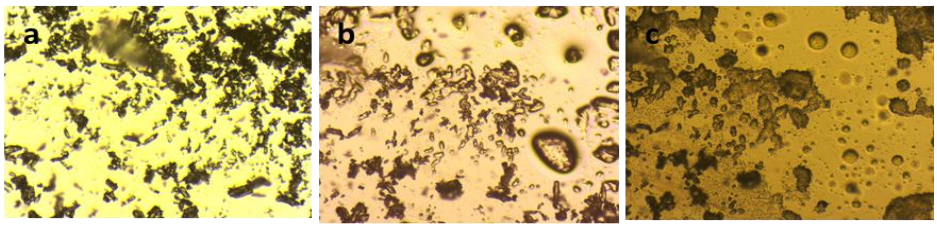


Figura 17. Secuencia de fotografías obtenidas por HSM de TM/DOC: (a) 110 °C; (b) 171 °C; (c) 246 °C.

En las mezclas físicas de los fármacos con PC, se observa una ausencia de la endoterma de fusión de los principios activos (Figuras 18 y 19), es decir, el equipo no detecta efecto de fusión alguno correspondiente al fármaco, lo que sugiere una interacción.

Cabe destacar que la PC es un producto semisólido de consistencia pastosa, que tras su calentamiento se reblandece y fluidifica. Este proceso ocurre en un amplio intervalo de temperaturas y el intercambio energético producido no es detectado por el equipo de DSC y por lo tanto, no se registra ningún pico en el termograma.

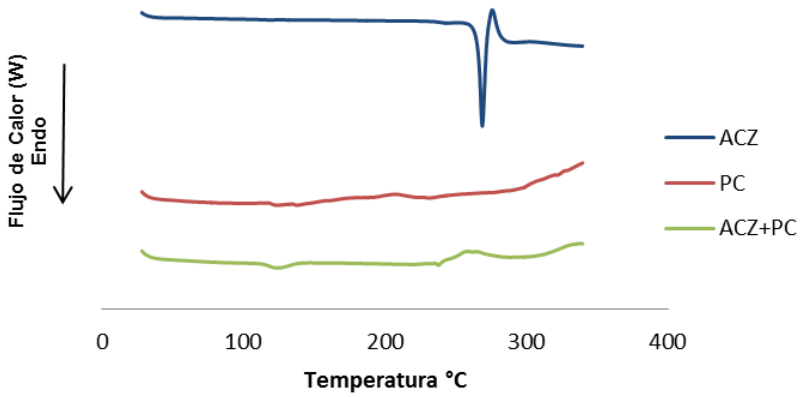


Figura 18. Termogramas correspondientes a acetazolamida (ACZ), fosfatidilcolina (PC) y su mezcla física 1:1.

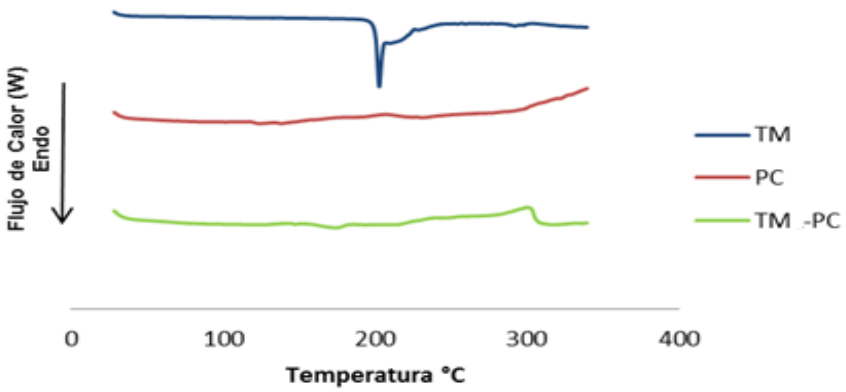


Figura 19. Termogramas correspondientes a timolol (TM), fosfatidilcolina (PC) y su mezcla física 1:1.

La interacción de la mezcla física de PC con los principios activos se estudió mediante HSM. Se observó que, al someter las muestras a calentamiento, la PC fundía y se producía una disolución gradual de las partículas del fármaco en dicho fundido (Figuras 20 y 21). El proceso transcurre en un amplio intervalo de temperaturas, de manera que cuando se alcanza la temperatura de fusión los principios activos, no existen partículas sólidas de fármaco que

puedan fundir y, en consecuencia, en el termograma no se registra la endoterma de fusión de los fármacos. Se ha demostrado la propiedad de algunas sustancias de naturaleza anfipática, como PC, para disolver principios activos cuando se encuentran formando una dispersión sólida (Ginés et al., 1995; Mura et al., 1998; Villasmil, 2010).

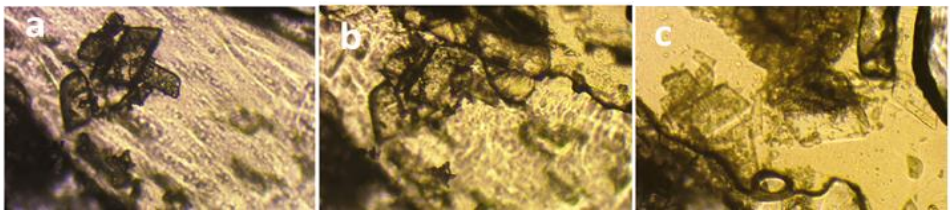


Figura 20. Secuencia de microfotografías obtenidas por HSM de la mezcla física ACZ/PC: (a) 25 °C; (b) 127 °C; (c) 150 °C.

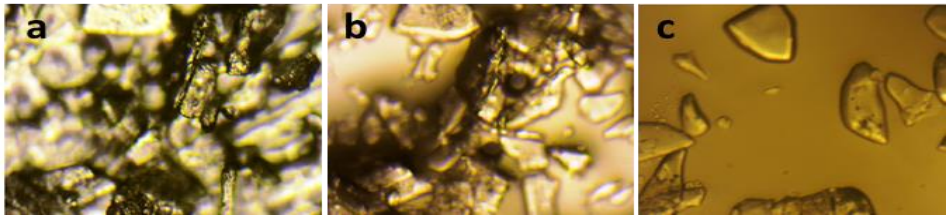


Figura 21. Secuencia de microfotografías obtenidas por HSM de la mezcla física TM/PC: (a) 25 °C; (b) 175 °C; (c) 184 °C.

4.1.6. Estudios de permeación *in vitro*

Se realizaron estudios de permeación *in vitro* para evaluar la influencia de la técnica de elaboración de las vesículas en la penetración del fármaco. Para ello, se colocaron cantidades iguales de la formulación elaborada por los diferentes métodos (TLE, REV, FAT y SON), incluyendo la solución de ACZ y TM en la superficie de la membrana artificial en el compartimiento donador para evaluar su capacidad de penetración a través de la membrana. La composición utilizada fue la formulación 2, la cual presentó mejores valores de PdE (ver apartado 4.1.2) con ACZ incorporada en la fase acuosa y TM en la fase oleosa. La cantidad de TM y ACZ permeada durante 24 h se representó en función del tiempo.

En las Figuras 22 y 23 se han representado los perfiles de permeación de cada activo para cada lote elaborado, usando como controles una solución

acuosa de ACZ y otra solución de TM, incorporadas en un gel de Carbopol® 940. De igual manera, los liposomas deformables fueron embebidos en el gel polimérico con el fin de aumentar el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular. Como es bien conocido, Carbopol® actúa formando una estructura de gel en medio acuoso, mostrando una interacción con los fosfolípidos (Aggarwal et al., 2007). Además, ha sido demostrado por otros autores que este hidrogel incrementa la permeación de algunos fármacos (Lehr et al., 1994).

Tal como se observa en las gráficas, la permeación de cada uno de los fármacos incrementó de forma directamente proporcional con el tiempo, mostrando una tendencia lineal en las primeras 4 horas. Al representar la cantidad de fármaco acumulada en el compartimiento receptor por unidad de área (Q/cm^2) frente al tiempo, se obtuvo una recta a partir de la cual pudieron calcularse los parámetros de permeación: flujo y coeficiente de permeabilidad. Los valores de estos parámetros se recogen en la Tabla 10.

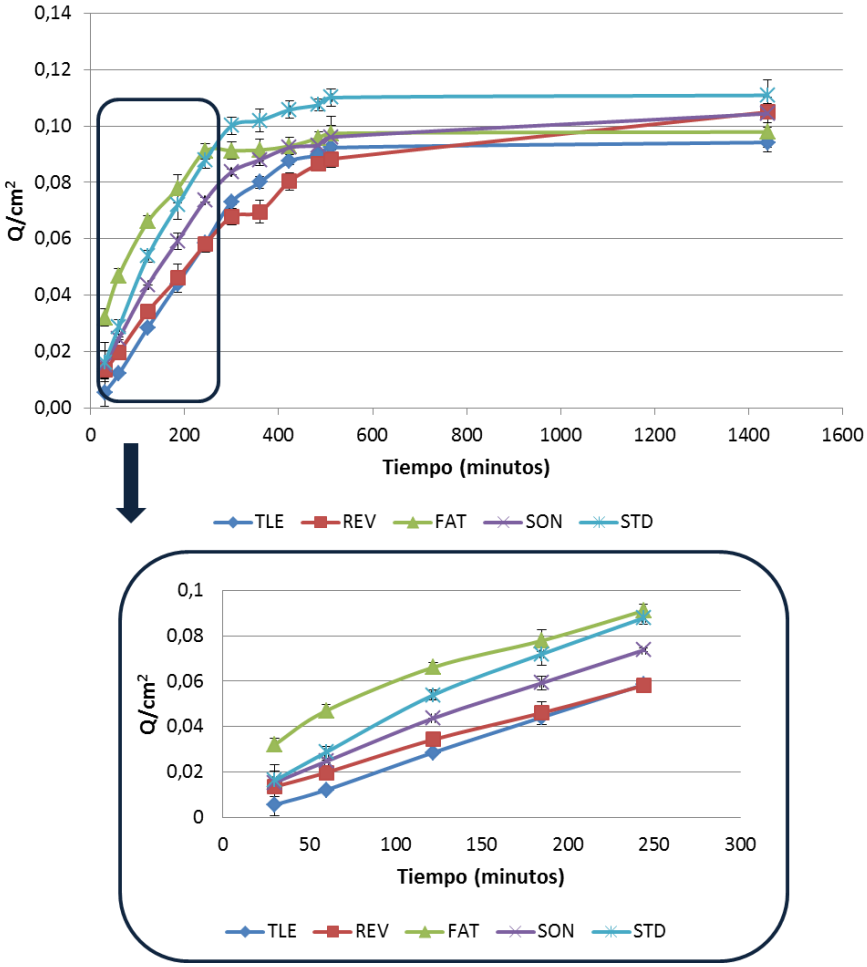


Figura 22. Perfiles de permeación de ACZ para las formulaciones elaboradas por diferentes técnicas.

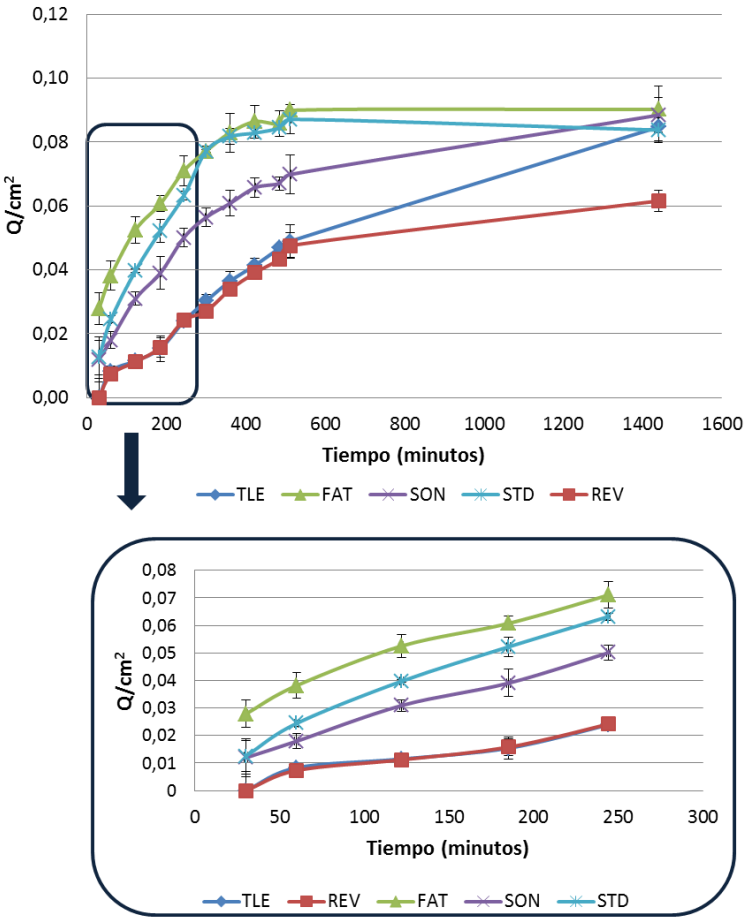


Figura 23. Perfiles de permeación de TM para las formulaciones elaboradas por diferentes técnicas.

	ACZ			TM		
	% permeado (24 horas)	J ($mg/cm^2/min$)	P (cm/min)	% permeado (24 horas)	J ($mg/cm^2 \cdot min$)	P (cm/min)
TLE	55,82	$2,50 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	50,20	$1,00 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-5}$
REV	62,19	$2,10 \times 10^{-4}$	$8,40 \times 10^{-5}$	36,49	$1,00 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-5}$
FAT	58,02	$2,60 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-4}$	53,47	$1,90 \times 10^{-4}$	$7,60 \times 10^{-5}$
SON	61,82	$2,70 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-4}$	52,42	$1,80 \times 10^{-4}$	$7,20 \times 10^{-5}$
STD	65,71	$3,40 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$	49,64	$2,30 \times 10^{-4}$	$9,20 \times 10^{-5}$

Tabla 10. Valores obtenidos de porcentaje de permeación de ACZ y TM, coeficiente de permeabilidad (P) y flujo (J) para cada lote ensayado. Std: Estándar.

Los resultados obtenidos demuestran que los coeficientes de permeabilidad (P) y los valores de flujo (J) están directamente relacionados con el porcentaje de permeación en cada formulación. El flujo permeado de ACZ fue similar en las diferentes formulaciones. Para dilucidar matemáticamente el hecho de que los flujos producidos en las diferentes formulaciones ocasionaban perfiles de permeación similares de ACZ a partir de las diferentes muestras, se determinó el factor de similitud (f_2) comparando cada uno de ellos con el obtenido en la solución estándar (Tabla 11).

Formulación	f_2
TLE	44,7
REV	43,5
FAT	57,4
Sonicación	57,5

Tabla 11. Factores de similitud (f_2) obtenidos para los perfiles de permeación de ACZ.

Un valor entre 50 y 100 para f_2 es considerado aceptable con una diferencia del 10% entre los perfiles. Como se puede apreciar, los perfiles de permeación de los liposomas deformables FAT y sonicados se ajustan a este caso al compararlos con el perfil que resulta de la solución estándar (57,4 y 57,5, respectivamente). Este comportamiento podría atribuirse al hecho de

que la formulación FAT no es estable, por lo cual la modulación en la permeación dada por el sistema liposomal se desvanece. Respecto al lote sonicado, éste presentó una liberación rápida del fármaco debido fundamentalmente al tamaño reducido de las vesículas y a la baja eficacia de atrapamiento de las mismas (Maestrelli et al., 2006). En cambio, las formulaciones TLE y REV presentaron un perfil de permeación más lento que el resto de formulaciones debido al mayor tamaño de las vesículas, dando lugar a valores de f_2 de 44,7 y 43,5, respectivamente.

En lo que respecta a TM (Figura 23), se observó un comportamiento de permeación más variable que ACZ (Figura 22) entre las técnicas de elaboración. Al igual que ocurrió con la permeación de ACZ, la formulación elaborada por el método FAT presentó un perfil similar al estándar debido a las características antes mencionadas referentes a la formulación. El resto de formulaciones mostraron el siguiente orden en la permeación del fármaco: SON>TLE>REV, lo cual pudo atribuirse principalmente al tamaño de las vesículas (Maestrelli et al., 2006), aunque también habría que destacar la influencia de la carga de fármaco libre no encapsulada que tendría un efecto *burst* al inicio del proceso, y que queda más enfatizado en aquellas formulaciones con menor cantidad de fármaco atrapado en las vesículas.

Cabe destacar en los perfiles una segunda etapa en la cual las formulaciones SON, TLE y REV no han alcanzado el nivel asintótico, lo cual hacer pensar que seguirá permeando el fármaco tras las 24 horas de iniciado el proceso.

En cuanto al porcentaje permeado de los fármacos a través de la membrana, se esperaba que TM permeara en una mayor proporción que ACZ debido a su elevada solubilidad en agua. Por el contrario, se obtuvieron menor velocidad de flujo (Tabla 10). Este resultado pudo justificarse en base a una interacción que podría producirse entre las cargas positivas de TM y negativas del Carbopol®, que favorece el atrapamiento del fármaco dentro de la red polimérica e impide la permeación adecuada al medio receptor (Bhanja et al., 2010; Gupta y Vyas, 2010).

Con esta hipótesis, se llevó a cabo la permeación de la formulación 2 sin gel de Carbopol® (Figura 24) y se observó que, en este caso, la permeación del TM a través de la membrana fue notablemente mayor, no percibiéndose esta diferencia en lo que se refiere a ACZ.

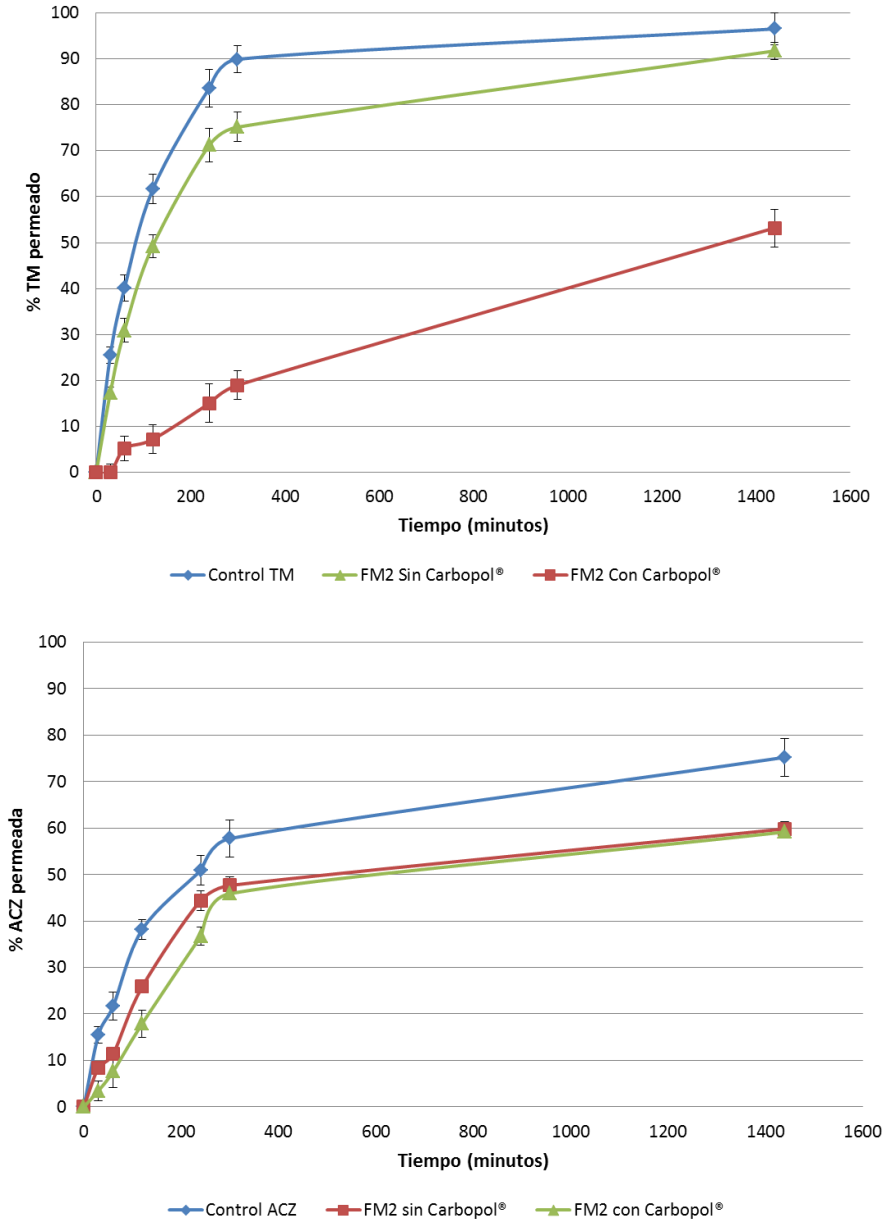


Figura 24. Comparativa de permeación de fármacos en ausencia de vehículo e incorporados en Carbopol®. Porcentaje de permeación de TM (superior) y ACZ (inferior) vs tiempo.

Como conclusión a este apartado, es posible afirmar que la permeación de los fármacos a través de la membrana artificial se ve influenciada principalmente por el tamaño de las vesículas, y condicionado por la técnica utilizada para su elaboración. No obstante, hay que considerar que la

fracción no encapsulada del fármaco puede tener un efecto positivo en la permeación, mayoritariamente en las etapas iniciales del proceso, y que la incorporación en un gel de Carbopol®, en este caso, no resultó beneficiosa.

4.1.7. Estudios de liberación *in vitro*

El estudio de liberación *in vitro* se realizó con el fin de dilucidar la influencia del tipo de vesícula, dado principalmente por la técnica de elaboración, en la liberación de los fármacos desde los liposomas deformables. La composición de las vesículas, al igual que en el ensayo de permeación, fue el de la formulación 2. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Para obtener los perfiles de liberación, se representó gráficamente el porcentaje de liberación de los diferentes lotes frente al tiempo, incluyendo como control una solución estándar de los fármacos (Figura 25 y 26). Como cabe esperar, se observaron dos comportamientos claramente diferenciados: el primero, el perfil correspondiente a la solución de los principios activos, que libera rápidamente y el segundo, los perfiles de fármaco liberado a partir de las dispersiones coloidales, donde se visualiza una modulación en la liberación de los fármacos.

Globalmente, puede afirmarse que al cabo de las nueve horas de iniciado el ensayo, la mayoría de formulaciones han liberado el 90% de los principios activos. Según los perfiles obtenidos, en general, la liberación de ACZ se da de forma más lenta que la de TM. Este resultado puede estar directamente relacionado con la baja solubilidad en agua de este fármaco.

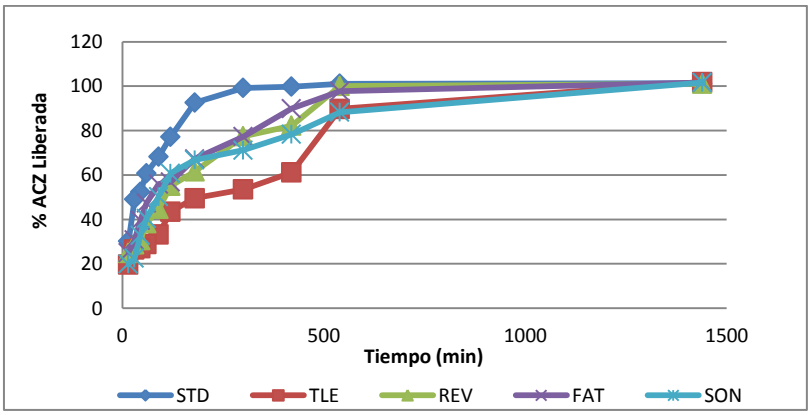


Figura 25. Perfiles de liberación de ACZ para las formulaciones elaboradas por diferentes técnicas.

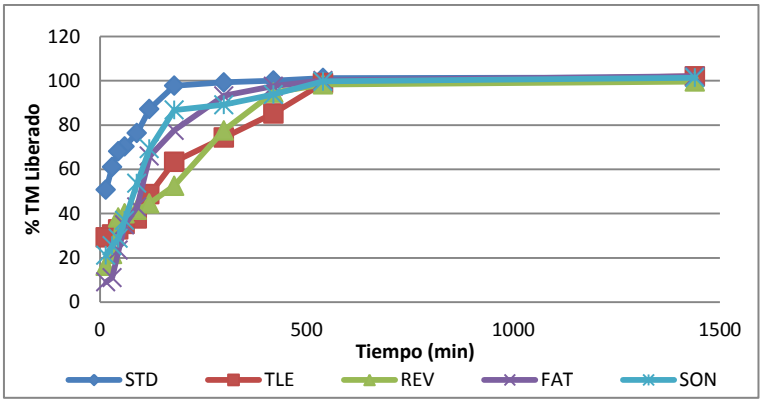


Figura 26. Perfiles de liberación de TM para las formulaciones elaboradas por diferentes técnicas.

Los perfiles de las formulaciones muestran una fase inicial, donde se presenta una liberación rápida del fármaco, correspondiente a la fracción no encapsulada del mismo en el liposoma. Seguida de esta etapa, la liberación es más lenta, y coincide con la salida del fármaco encapsulado en las vesículas. Este comportamiento se observa acentuado en la formulación de los liposomas que fueron sometidos a sonicación, ya que presentaron un alto porcentaje de fármaco no encapsulado. Además, estas vesículas al poseer un tamaño pequeño presentan mayor superficie de contacto que favorece la liberación de los principios activos en el medio receptor.

En los perfiles de liberación de TM, se evidencia una superposición de las curvas obtenidas a partir de las distintas dispersiones liposomales, por lo que se puede concluir que el método de elaboración no afectó a la liberación de este principio activo. Un comportamiento similar de los perfiles se observa para el caso de ACZ, con la excepción del perfil TLE, el cual libera más lentamente. Dicho efecto modulador de la liberación se explica teniendo en cuenta la disposición de las láminas concéntricas existentes en las vesículas MLV, separadas por compartimentos acuosos. En este caso, la liberación del fármaco desde dichos compartimentos se lleva a cabo gradualmente (Guinedi et al., 2005).

Con el fin de conocer el mecanismo de liberación de los principios activos desde los liposomas, se han realizado ajustes cinéticos a los modelos orden cero, primer orden e Higuchi. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

	ACZ			TM		
	Orden cero	**Orden uno**	**Higuchi**	**Orden cero**	**Orden uno**	**Higuchi**
STD	0,4100	0,3368	0,6608	0,3935	0,3577	0,6411
TLE	0,8128	0,6769	0,9363	0,6732	0,5890	0,8708
REV	0,6467	0,5393	0,8610	0,6052	0,4790	0,8232
FAT	0,6203	0,4931	0,8460	0,4752	0,3388	0,7237
SON	0,6553	0,4740	0,8636	0,4730	0,3869	0,7163

Tabla 12. Coeficientes de determinación obtenidos del ajuste cinético de los perfiles de liberación de TM y ACZ de las diferentes formulaciones.

De forma general, se observa que los coeficientes de determinación del modelo Higuchi son mayores comparados con el modelo cinético de orden cero y uno, indicando un mejor ajuste de la cinética de liberación de los fármacos a este modelo. Por lo tanto, y como cabría esperar, la liberación de ambos fármacos desde los liposomas deformables se llevó a cabo a través de un mecanismo de difusión. Resultados similares fueron obtenidos por Guinedi et al. (2005), quienes concluyeron que el proceso de liberación de ACZ a partir de niosomas multilaminares siguió una cinética de liberación cuyo mecanismo se ajustó a un proceso de difusión controlada.

4.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se ha desarrollado y validado un método analítico por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) para la determinación de ACZ y TM en liposomas deformables con la mejor resolución posible para los dos picos cromatográficos. Este método permite el análisis de un gran número de muestras, evitando la posible degradación asociada a un largo tiempo de análisis. La preparación de las muestras fue sencilla, el tiempo de separación corto, con un valor bajo para el límite inferior de cuantificación en la línea base. El objetivo del método requiere eliminar la interferencia de otros constituyentes de la formulación permitiendo que el método sea reproducible, con alta recuperación y empleando un número mínimo de etapas.

4.2.1. Idoneidad del sistema

La idoneidad del sistema se ha verificado midiendo los parámetros cromatográficos y la precisión del sistema HPLC antes de proceder a la validación. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

ACZ						
	Área	**Tm**	**tR**	**W**	**N**	**K**
1	8000937	0,727	1,927	0,31	605,47	1,65
2	8000271	0,727	1,920	0,31	600,77	1,64
3	8008656	0,727	1,920	0,31	600,45	1,64
4	8007420	0,727	1,927	0,31	602,58	1,65
5	8005767	0,727	1,920	0,31	603,26	1,64
6	7997357	0,727	1,913	0,31	605,37	1,63
$\bar{X}$	8003401,333	0,727	1,921	0,31	602,98	1,64
CV (%)	0,051	0	0,250	0,30	0,33	0,40
TM						
	Área	**Tm**	**tR**	**W**	**N**	**K**
1	10408566	0,727	4,093	0,37	1996,19	4,63
2	10425939	0,727	4,093	0,37	1993,23	4,63
3	10414689	0,727	4,08	0,37	1988,75	4,61
4	10428805	0,727	4,087	0,37	1987,87	4,62
5	10433250	0,727	4,087	0,37	1986,27	4,62
6	10448991	0,727	4,087	0,37	1989,71	4,62
$\bar{X}$	10426706,67	0,727	4,088	0,37	1990,34	4,62
CV (%)	0,125	0	0,108	0,08	0,17	0,13

Tabla 13. Resultados de idoneidad del sistema para ACZ y TM. Donde tm: tiempo muerto, tR: tiempo de retención, W: ancho de la banda, N: número de platos teóricos, K: factor de capacidad, $\bar{X}$: promedio.

Los resultados de idoneidad del sistema indicaron que la exactitud del sistema como parámetro de mayor aplicación para la evaluación de la idoneidad del mismo fue óptima para iniciar la validación. Se obtuvo una variabilidad en los valores de área de pico de ACZ y TM inferior al 1% ($\%CV_{ACZ}$ = 0,051 y $\%CV_{TM}$ = 0,125) garantizando así una dispersión mínima entre inyecciones repetidas. Además, se verificó que los tiempos de retención de los picos no presentaron un desplazamiento significativo (1,921 ± 0,250 y 4,088 ± 0,108 min para ACZ y TM, respectivamente). Se analizó el factor de capacidad (K), siendo mayor que la unidad, lo que indica una buena interacción entre la fase móvil y la fase estacionaria (RP 18) (K_{ACZ} = 1,64 y K_{TM} = 4,62), que permitirá una buena separación entre los dos componentes. Este hecho se refleja en el coeficiente de selectividad (α = 2,8) y en el valor de resolución cromatográfica (R_s = 6,4). La elución de los picos se completó en un tiempo de 5 minutos y se obtuvo un número de platos teóricos

N≈2000, demostrándose así la eficiencia y eficacia del sistema cromatográfico. A título de ejemplo, en la Figura 27 se recoge un cromatograma del ensayo.

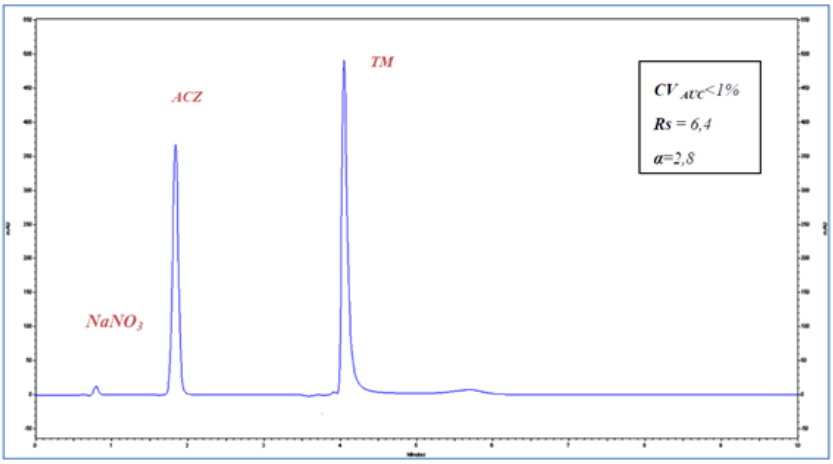


Figura 27. Cromatograma de la prueba de idoneidad del sistema. Se indica el pico correspondiente a $NaNO_3$, TM y ACZ y parámetros cromatográficos. CV: Coeficiente de variación, Rs: Resolución del sistema y α: factor selectivo.

4.2.2. Selectividad

El estudio de selectividad consistió en evaluar de manera cuali y cuantitativa la influencia de los constituyentes de las formulaciones de los liposomas deformables sobre el tiempo de retención, pureza cromatográfica y espectral y área del pico de ACZ y TM, además de los posibles procesos de degradación que pudieran experimentar estos principios activos bajo condiciones de estrés.

4.2.2.1. Selectividad cualitativa

Los picos de ambos fármacos se separaron con un tiempo de retención de 1,86 y 4,27 minutos para ACZ y TM, respectivamente. Ambas moléculas presentan buenas propiedades de absorción a esta longitud de onda (286 nm) establecida en el desarrollo del método analítico, aprovechando las características estructurales de ambos cromóforos. Como se observa en el cromatograma perteneciente a la muestra de liposomas deformables sin fármaco versus solución estándar del activo (Figura 28), el resto de constituyentes de la formulación (línea verde) no aparecen al mismo tiempo de retención de los fármacos. Gráficamente, se observó la ausencia de

interferencia. La Figura 29 recoge la información que verifica la pureza cromatográfica y espectral de ACZ y TM utilizados en este estudio, no observándose picos de posibles productos de degradación en los cromatogramas, y no superponiéndose espectroscópicamente.

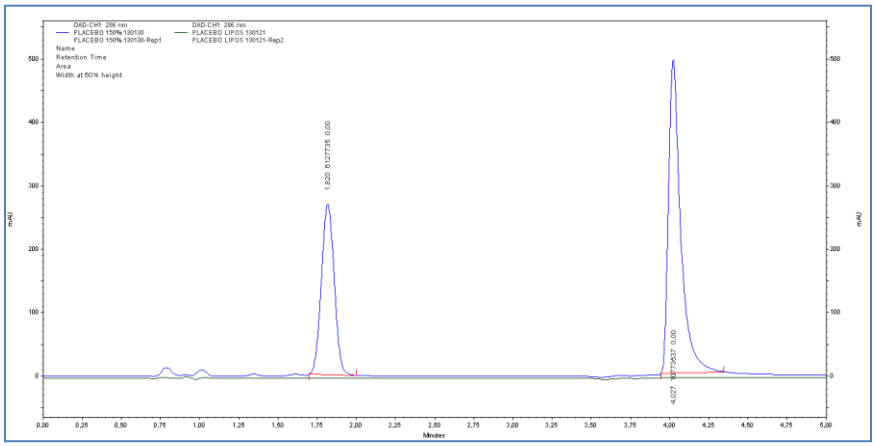


Figura 28. Selectividad cualitativa. Estándar de ACZ y TM (en azul) versus liposomas deformables sin fármaco (en verde).

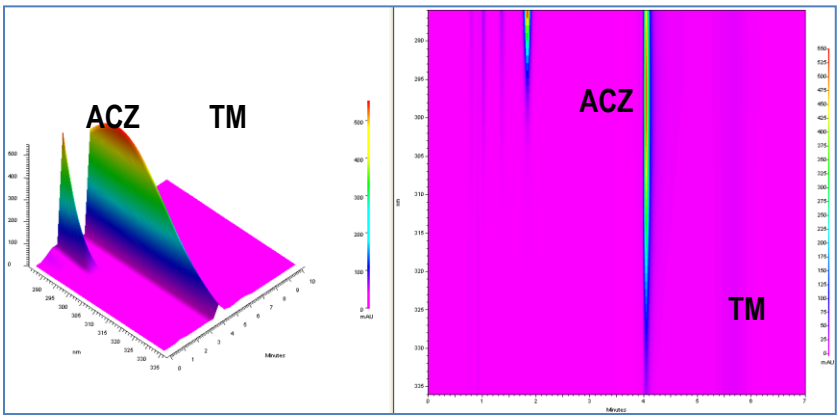


Figura 29. Selectividad cualitativa. Evaluación cromatográfica y espectroscópica de ambos fármacos.

4.2.2.2. Selectividad cuantitativa

La selectividad cuantitativa se demostró mediante la realización de un estudio estadístico donde se comprobó la influencia que tienen los constituyentes de los liposomas deformables sobre la respuesta generada

por el sistema cromatográfico en términos de área bajo la curva de los picos correspondientes a ACZ y TM. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de una prueba Shapiro-Wilks, F-Snedecor y t-Student (Software G-Stat Student 2,0). A partir de las áreas de los cromatogramas correspondientes a las muestras de solución estándar y liposomas (Tabla 14), se obtuvo que el porcentaje de discrepancia entre el estándar y los liposomas cargados fue inferior al 5%, indicativo de un bajo grado de dispersión de los resultados. Mediante Shapiro-Wilks observamos que los valores W_{exp} fueron superiores a W_{tabla} (Tabla 15), verificando que los datos presentaban una distribución normal. En base a los valores de p (p ACZ = 0,1353; p TM = 0,0124), la F-Snedecor confirmó la homogeneidad de las varianzas entre los dos grupos analizados (liposomas cargados *vs* estándar) en un 99% de confianza estadística. Finalmente, el valor de la prueba t-Student para la prueba de muestra independiente tuvo un valor p (p_{ACZ} = 0.0002E-4; p_{TM} = 0.0012) inferior a 0,05, lo que demostró la selectividad cuantitativa del método que compara la muestra estándar con la del liposoma que incluyó los fármacos.

Solución estándar			**Liposomas con fármaco**		
N°	**Área ACZ**	**Área TM**	**N°**	**Área ACZ**	**Área TM**
1	8000937,0	10408566	**1**	7893298,4	10698604,1
2	8000271,0	10425939	**2**	7886308,9	11103429,5
3	8008656,0	10414689	**3**	7898521,3	10980257,9
4	8007420,0	10428805	**4**	7807574,1	10813474,0
5	8005767,0	10433250	**5**	7857817,0	10893410,8
6	7997357,0	10448991	**6**	7807375,8	10924894,9
7	8063028,0	10516231	**7**	7912331,5	10918878,2
8	8013397,0	10355299	**8**	7867835,7	10864482,3
9	8037259,0	10435765	**9**	7858871,3	10865259,3
Promedio	8014899,1	10429726,11	**Promedio**	7865548,2	10895854,5
%CV	0,253	0,380	**%CV**	0,45	0,96
% discrepancia		**ACZ**	**TM**		
		1,86	4,27		

Tabla 14. Análisis de selectividad cuantitativa. Comparación de las áreas entre placebo cargado y estándares de ACZ y TM.

Solución de liposomas cargados			Solución de estándar		
Fármaco	ACZ	TM	**Fármaco**	ACZ	TM
Var	1259066120	11022812723	**Var**	412618639	1570174251
1/(n x Var)	8,82488E-11	1,00801E-11	**1/(n x Var)**	2,6928E-10	7,0764E-11
W_{exp}	0,89863443	0,965458556	**W_{exp}**	0,76792433	0,89922872
W_{tabla}	0,764		**W_{tabla}**	0,764	

Tabla 15. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks, para distribución normal de datos de liposomas cargados y los estándares. Var: varianza, n: número de muestras, W_{exp}: resultado de la prueba Shapiro-Wilks, W_{Tabla}: valor tabulado del estadístico de Shapiro-Wilks.

Con estos ensayos, se ha demostrado de forma cuali y cuantitativa la selectividad del método analítico, garantizando de esta forma la veracidad de los siguientes ensayos.

4.2.2.3. Estudios de degradación forzada

La selectividad también se demostró induciendo la degradación de ACZ y TM. Los resultados, que quedan plasmados en la Tabla 16, mostraron que ACZ es muy susceptible a la mayoría de los factores de estrés, en torno a un 19%. Respecto a TM, se verifica un efecto negativo importante en la reducción de las áreas de los picos cuando se ve afectado por ambientes oxidantes (42,7%) y alcalinos (32%). Estos resultados son consistentes con el comportamiento que deben tener las moléculas de acuerdo a su naturaleza química ya que, siendo ACZ una molécula alcalina, es muy vulnerable frente a los medios ácidos. Por el contrario, a una molécula de ácido como TM le afectan los entornos alcalinos. Estos resultados se contrastaron con los cromatogramas (datos no mostrados) que indican que la fracción degradada no se retiene en el mismo tiempo que ACZ o TM. De acuerdo con las áreas obtenidas, se puede concluir que los fármacos son inestables en estas condiciones, y se tendrán en cuenta durante los estudios posteriores.

Condiciones	Degradación ACZ (%)	Degradación TM (%)
Luz	19,4	1,7
UV	13,3	2,2
C-S	18,4	4,0
Ácidas	18,3	3,0
Básicas	18,1	32,0
Reducción	13,4	0,8
Oxidación	11,5	42,7

Tabla 16. Resultados de las soluciones de estudio de degradación de ACZ y TM bajo estrés. C-S: Calor-sonicación.

4.2.3. Linealidad

4.2.3.1. Linealidad del sistema

El sistema cromatográfico mostró una respuesta lineal y directamente proporcional en un intervalo de concentraciones amplio para la concentración diana del analito. La concentración de la solución de ensayo al 100% fue de 0,5 mg/mL y este parámetro se evaluó en un rango 50-150% de la concentración diana de ensayo. La Tabla 17 recoge los resultados de este análisis.

			ACZ		TM	
Nivel (%)	**R**	**[Final] (mg/mL)**	**Area (mAU· s)**	**Factor respuesta (f)**	**Area (mAU· s)**	**Factor respuesta (f)**
I (50%)	3	0,250	3218316,0	64366,3	5206104,7	100117,3
II (75%)	3	0,375	4759506,0	62625,1	7253957,0	95446.8
III (100%)	3	0,500	6329793,3	63297,9	9871413,7	98714,1
IV (125%)	3	0,625	7681061,0	61944,0	12068026,0	97322,8
V (150%)	3	0,750	9106651,3	60711,0	14311038,3	95406,9
Media f			62588,9		97401,6	
DE f			1242,3		1860,8	
CV			1,98		1,91	

Tabla 17. Datos correspondientes a las soluciones estándar ACZ y TM para determinar la linealidad del sistema.

La recta de calibración obtenida fue lineal en el intervalo de concentración mencionado anteriormente. La ecuación de regresión obtenida para ACZ y TM fue y = 59255x + 293609 (R^2 = 0.9989) e y = 94323x + 272079 (R^2 = 0.9983); (siendo *y* la concentración del fármaco (mg/mL) y *x*: área del pico), respectivamente. Igualmente, se pudo observar la existencia de homocedasticidad, como se refleja en la representación gráfica de los residuales versus la concentración estimada (Figura 30) ya que existe una distribución aleatoria y no refleja ninguna tendencia, verificando de este modo la validez del modelo experimental.

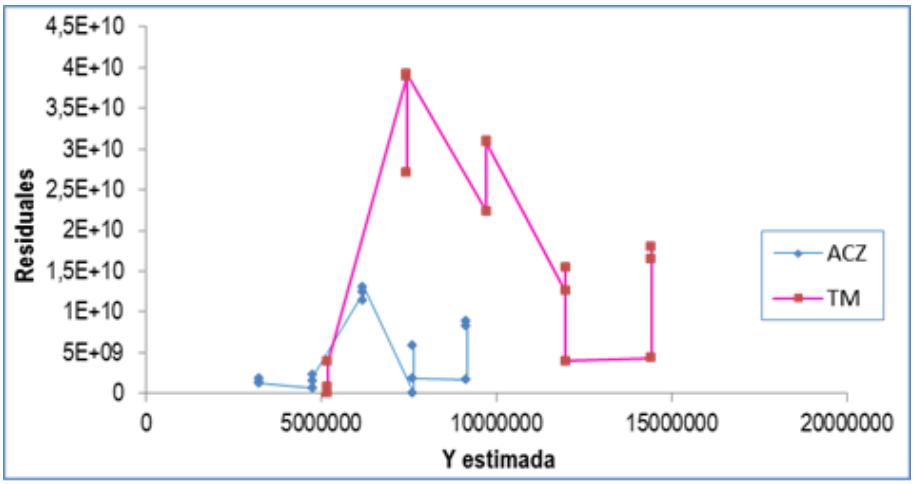


Figura 30. Representación gráfica de la homocedasticidad del sistema, por análisis de residuales.

Asimismo, el análisis estadístico de ANOVA corrobora que existe una bondad en el ajuste de los datos (p = 0.0001E-16 y 0.0002E-15 para ACZ y TM, respectivamente) y mediante el Test de Cochran (G_{exp} = 0,59 y 0,64 para ACZ y TM, respectivamente) se verificó la homogeneidad de varianzas, ya que estos valores son menores que el tabulado (0,68) (α = 0,05) (k = 5, n = 3), lo que se traduce en una homogeneidad de las varianzas de las concentraciones, y ausencia de influencia del factor concentración en la variabilidad de los resultados.

Posteriormente, la linealidad se evaluó en dos estudios. En primer lugar, se determinaron los coeficientes de variación (CV) de los factores de respuesta (f). Para ambos activos fue inferior a 2% (CV_{ACZ} = 1,98; CV_{TM} = 1,91), hecho que se confirmó gráficamente al ver que, en la representación de los factores

respuesta frente a la concentración, no se apreció un cambio en el valor de la pendiente (Figura 31).

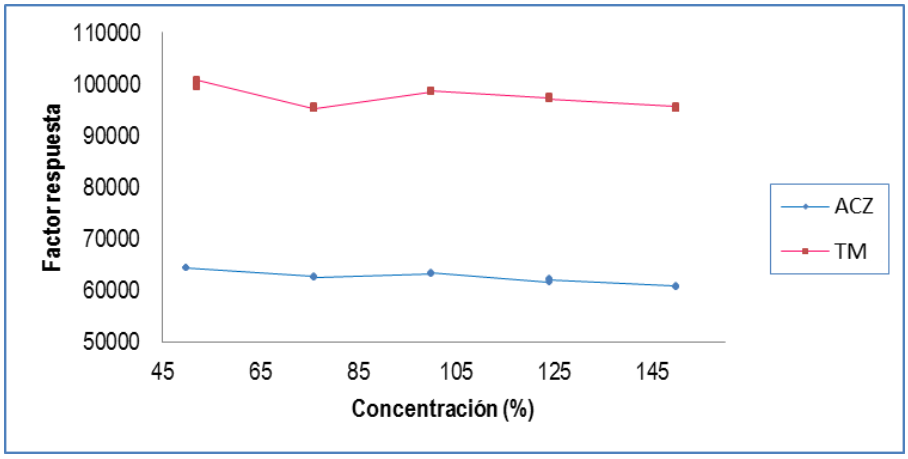


Figura 31. Representación gráfica de los factores respuesta vs concentración de activo.

El segundo estudio fue el análisis de significación estadística de la desviación estándar de la pendiente, cuyo valor fue t_{exp} = 3,2 y 5,3 para ACZ y TM, respectivamente, siendo estos valores superiores a t_{tab} = 2,16, lo que indicó que las pendientes obtenidas eran estadísticamente diferentes de cero, con una confianza del 95% (Tabla 18). Además, los intervalos de confianza de la pendiente obtenidos para ACZ y TM fueron $1{,}9x10^4$ - $9{,}9x10^4$ y $1{,}3x10^4$ - $5{,}6x10^4$, respectivamente.

Finalmente, se desarrolló el test de proporcionalidad para analizar la varianza de la ordenada en el origen (Sa) obteniéndose valores de t_{exp} para ambos fármacos (t_{exp} = 0,00142 y 0,00135 para ACZ y TM, respectivamente) menores que t_{tab} (2,16), demostrándose que la línea pasa a través del origen y su intervalo de confianza incluye cero, siendo éstos para ACZ: $-4{,}5x10^8$ a $4{,}5x10^8$ y TM: $-4{,}3x10^8$ a $4{,}4x10^8$.

En la Tabla 18 se recopila un resumen de la información correspondiente a la aplicación de los diferentes test en la linealidad del sistema.

Test		ACZ	TM
Test Cochran Homogeneidad de varianzas	G_{exp}	0,59	0,64
	G_{tab}	0,68	
Test de Student: Desviación estándar de la pendiente Varianza de la pendiente (Sb)	T_{exp}	3,2	5,3
	T_{tab}	2,16	
	Intervalo Sb	1,9E4-9,9E4	3,9E4-1,3E5
Test de Student: Test de proporcionalidad Varianza de la ordenada en el origen (Sa)	T_{exp}	0,00142	0,00135
	T_{tab}	2,16	
	Intervalo Sb	-4,5E8 a 4,5E8	-4,3E8 a 4,4E8

Tabla 18. Resultados de los diferentes estudios estadísticos para la linealidad del sistema.

4.2.3.2. Linealidad del método

De forma similar a la linealidad del sistema, la linealidad del método se demostró mediante las ecuaciones de regresión: ACZ, y = 56223x + 181419 (R^2 = 0,9984); y TM, y = 67786x + 155899 (R^2 = 0,9996), valor p de ANOVA 0,0001E-15 y 0,0003E-19 para ACZ y TM, respectivamente, confirmándose la bondad en el ajuste lineal de los datos. Estos resultados se complementan con los ensayos del test de Cochran en los que $G_{exp} < G_{tab}$ para ambos fármacos (Tabla 18). Se concluyó, por tanto, que el factor de concentración no afecta la variabilidad de la respuesta. Los resultados se muestran en la Tabla 19. La prueba de normalidad residual demostró la homogeneidad y la homocedasticidad de las varianzas, como se refleja en las Figuras 32 y 33.

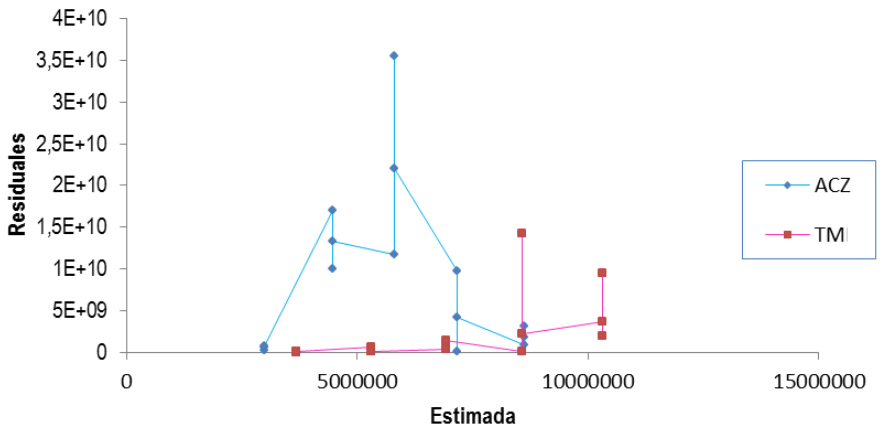


Figura 32. Representación gráfica de la homocedasticidad por análisis de residuales.

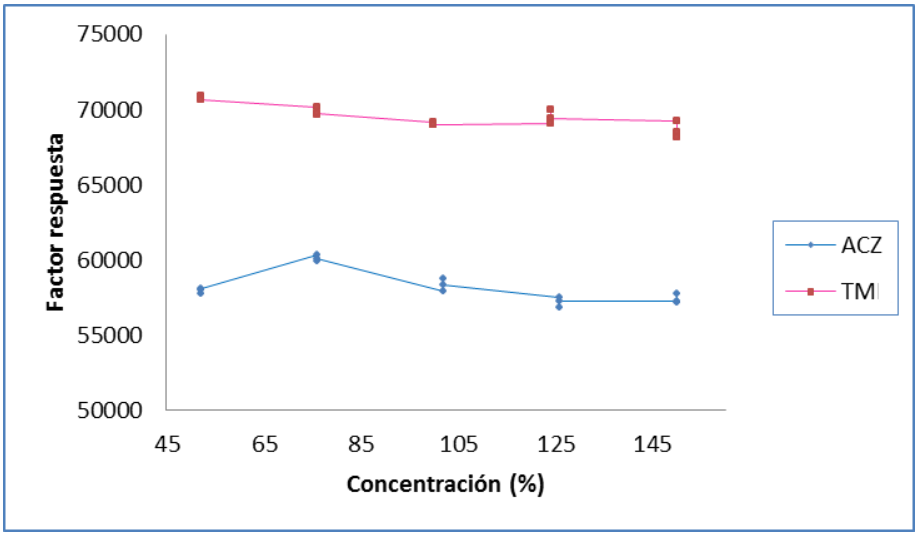


Figura 33. Representación gráfica de los factores respuesta vs concentración de activo. Linealidad del método.

La prueba de linealidad se probó adicionalmente mediante el cálculo de factores de respuesta. Además, verificó que la pendiente fue estadísticamente diferente de cero donde $t_{exp} > t_{tab}$ (Tabla 20). Finalmente, se encontró que la intersección fue estadísticamente igual a cero en sus intervalos de confianza. Con este ensayo de linealidad de sistema y método se demostró que tanto el sistema de HPLC como el método cromatográfico eran lineales en el intervalo de concentración estudiado.

			ACZ		TM	
Nivel (%)	**R**	**[Final] (mg/mL)**	**Área (mAU s)**	**Factor respuesta (f)**	**Área (mAU s)**	**Factor respuesta (f)**
I (50%)	3	0,250	3013864,7	57958,9	3679857,0	70766,5
II (75%)	3	0,375	4569465,3	60124,5	5309521,7	69862,1
III (100%)	3	0,500	5952128,3	58354,2	6904204,0	69042,0
IV (125%)	3	0,625	7211074,7	57230,8	8617911,0	69499,3
V (150%)	3	0,750	8609512,3	57396,7	1029670,3	68644,8
Media f			58213,0		69562,9	
DE f			1066,0		782,5	
CV			1,8		1,12	

Tabla 19. Linealidad del método con liposomas de muestra de ACZ y TM.

Test		ACZ	TM
Test Cochran Homogeneidad de varianzas	G_{exp}	0,32	0,47
	G_{tab}	0,68	
Test de Student: Desviación estándar de la pendiente Varianza de la pendiente (Sb)	T_{exp}	3	3,8
	T_{tab}	2,16	
	Intervalo Sb	$1,6X10^4$-$9,6X10^4$	$3,9X10^4$-$1,3X10^5$
Test de Student: Test de proporcionalidad Varianza de la ordenada en el origen (Sa)	T_{exp}	0,00142	0,00135
	T_{tab}	2,16	
	Intervalos Sa	$-4,5 \times 10^8$ a $4,5 \times 10^8$	$-4,3 \times 10^8$ a $4,4 \times 10^8$

Tabla 20. Resultados de los diferentes estudios estadísticos para la linealidad del método.

4.2.4. Precisión

La precisión expresa la importancia que tienen los errores aleatorios en el rendimiento del método. Como se ha referido en el apartado metodología, este parámetro se ha validado intra-día (repetibilidad del sistema) e inter-día (precisión intermedia).

4.2.4.1. Repetibilidad

A partir de los resultados obtenidos para ambos ensayos (sistema y método) recogidos en la Tabla 21, se puede concluir que la repetibilidad es satisfactoria porque la desviación estándar relativa (RSD) era inferior al 2%, tomado como criterio de aceptación. La concentración de las soluciones estándar fue 0,5 mg/mL (100%).

	ACZ	TM
Sistema	19973570,43	29148566,07
%RSD	0,051	0,125
Método	19187325,67	28927387,92
%RSD	0,2970	0,3702

Tabla 21. Resultados repetibilidad del sistema y del método.

4.2.4.2. Precisión intermedia

Para evaluar la precisión intermedia, se realizó un estudio de repetibilidad adicional para comparar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores en dos días diferentes. Con ello se pretende analizar si las condiciones operativas y ambientales afectaban a la variabilidad de nuestros resultados. Cada estudio de repetibilidad se realizó mediante el análisis de tres inyecciones de tres muestras de liposomas deformables de ACZ y TM (0,5 mg/mL) preparadas por cada analista. Los resultados se muestran en la Tabla 22. El método analítico desarrollado fue repetitivo debido a que los resultados se encuentran por debajo del límite establecido de acuerdo con la variación aceptada (RSD < 2%).

		ACZ		TM	
ANALISTA	**DÍA**	**PROMEDIO AUC**	**CV (%)**	**PROMEDIO AUC**	**CV (%)**
1	1	18630029,0	0,07	27144868,3	1,52
1	2	19071568,7	0,09	28722705,0	1,44
2	1	19502276,5	0,14	27006837,9	0,92
2	2	20051287,4	0,14	30293886,5	1,05
CV id		0,14		0,98	
CV ia		0,11		1,23	

Tabla 22. Resultados de precisión intermedia con analistas y días diferentes, para muestras de liposomas deformables de ACZ y TM 0,5 mg/mL. id: inter-día; ia: inter-analista.

4.2.5. Exactitud

La exactitud del método analítico se evaluó utilizando cinco niveles de concentración (50, 75, 100, 125 y 150% de la dosis, 0,5 mg/mL) de liposomas que incluían los fármacos. Los resultados se expresaron como porcentaje de la cantidad teórica y experimental de fármaco y están recogidos en la Tabla 23. Los resultados mostraron valores dentro de los criterios de aceptación (100 ± 3%) requeridos por la FDA para métodos cromatográficos.

Asimismo, éstos indicaron que el porcentaje de recuperación está comprendido entre 97,2% y 103%, siendo la desviación estándar relativa media de 0,88%; de acuerdo con esto, el parámetro se consideró validado.

Además, el análisis de la homogeneidad de las varianzas mostró un valor de G_{exp} de 0,40 y 0,49 para ACZ y TM, respectivamente, que fue menor que el valor de G_{tab} (0,6838), lo que indica que las varianzas en todas las concentraciones fueron homogéneas y que el factor de concentración no tuvo efecto sobre la variabilidad de los resultados. Así se demostró que este método es exacto en todo el abanico de concentraciones del 50 al 150% del valor de la dosis establecida (0,5 mg/mL).

	ACZ		**TM**	
Concentración teórica (%)	**Concentración Práctica (%)**	**Recuperación (%)**	**Concentración Práctica (%)**	**Recuperación (%)**
50	49,0	98,1	48,6	97,2
75	73,2	97,7	71,6	95,5
100	100	99,9	101,4	101,4
125	123,2	98,6	128,8	103,0
150	146,8	99,2	150,2	100,1
Promedio		98,7		99,5
DE		0,87		3,1
CV (%)		0,88		3,1
G_{exp}		0,40		0,49

Tabla 23. Porcentajes de recuperación de ACZ y TM de liposomas deformables; y la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas.

4.2.6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Para determinar el LOD y LOQ, se inyectaron cinco soluciones estándar por triplicado a bajas concentraciones, en un intervalo del 1 al 25% de la concentración utilizada en las formulaciones (0,5 mg/mL), obteniéndose una curva de calibración cuya ecuación de la recta incluyendo el error estándar de la ordenada (SE_O) fue y = 69365,6x + 14413 (R^2 = 0,9998); SE_0 = 3457,11 e y = 94853,4x + 16002 (R^2 = 0,9998); SE_0 = 5177,5 para ACZ y TM, respectivamente. Se verifica de este modo que existe una excelente correlación y se mantiene la linealidad en este rango a bajas concentraciones. Aplicando las fórmulas especificadas en el apartado de metodología, se calcularon los LOD y LOQ. A continuación, con estas concentraciones teóricas obtenidas, se prepararon las soluciones y se inyectaron por sextuplicado, ratificando los valores, ya que el porcentaje RSD no fue superior al 10% para LOD y 5% para LOQ. La Tabla 24 recoge los resultados del ensayo de LOD y LOQ para ambos fármacos.

	ACZ	TM	RSD (%)
LOD	0,16%	0,18%	7,52
LOQ	0,49%	0,54%	4,83

Tabla 24. LOD y LOQ para ACZ y TM.

4.2.7. Robustez

La robustez del método desarrollado se determinó mediante el diseño de experimentos (DOE). En este estudio, se investigaron seis factores críticos (temperatura del horno, pH de la solución tampón, porcentaje de ACN en fase móvil, flujo de la fase móvil, longitud de onda de detección y volumen de inyección), cada uno de ellos con tres niveles diferentes, aplicando el método Taguchi. Las variables de respuesta investigadas fueron el área del pico (área bajo curva) y el tiempo de retención cromatográfico de cada fármaco. Se prepararon soluciones estándar de ACZ y TM a una concentración de 0,5 mg/mL (100%). La matriz ortogonal L_{27} se completó con los datos obtenidos y se analizó con el Software DOEpack 2000 v 3.0.22, el cual nos permitió estudiar el efecto de cada factor sobre las variables de respuesta a través del análisis de medias ANOM, análisis de varianzas ANOVA, gráfico de efectos principales e interacciones, diagramas de Pareto y el denominado Scree plot (Gráficas ANOM y ANOVA no mostradas en el Capítulo, quedando recogidas en el Anexo II).

4.2.7.1. Robustez para ACZ

- ***Tiempo de retención***

Mediante el análisis de los efectos principales (ANOM), se observó que los factores fuera de los límites de control fueron el pH de la fase móvil y la temperatura, hecho que se confirmó con ANOVA (15% y 83,8% contribución para la temperatura y pH, respectivamente). Por tanto, el análisis indicó que existe una influencia estadísticamente significativa de estos factores sobre el tiempo de retención (ANOVA $p < 0,001$ para ambos). Este fenómeno de influencia estadística se puede visualizar gráficamente en los gráficos de Pareto y *Scree plot* (Figura 34).

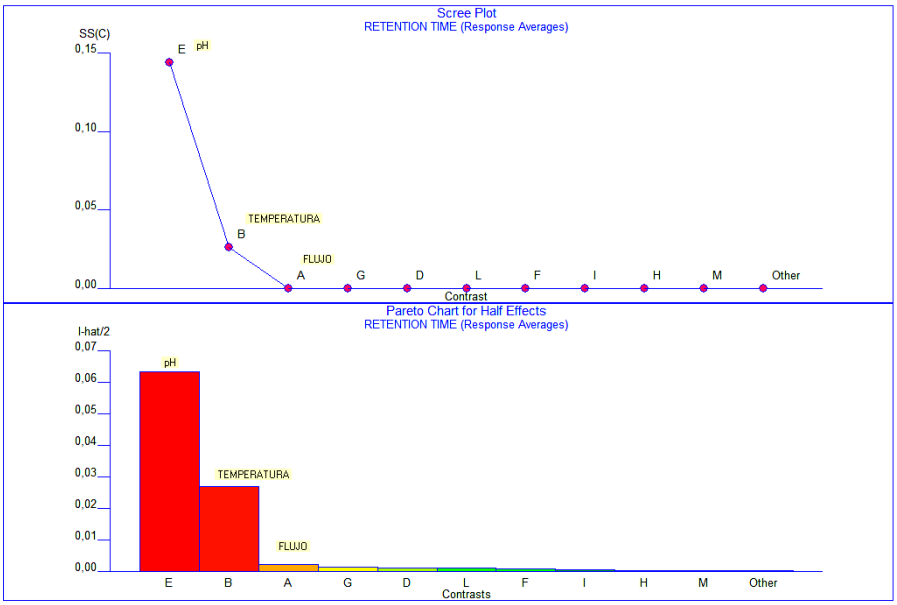


Figura 34. Gráficas de *Scree plot* y Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención para ACZ. A: Flujo; B: Temperatura horno; E: pH fase móvil; I: % ACN; J: Volumen inyección; L: longitud de onda.

La influencia del pH como efecto principal positivo cuando se pasa de un nivel inferior (3,9) a otro superior (4,3) sobre el tiempo de retención (Figura 35), es debida a la naturaleza alcalina de ACZ. Una ligera modificación en el pH de la fase móvil da lugar a un grado diferente de ionización del fármaco, que es responsable de una mayor o menor interacción entre el fármaco, la fase móvil y la fase estacionaria C-18. Estos resultados están en concordancia con los de otros autores que confirman que el perfil de solubilidad con el pH indica que la solubilidad es mayor en medio básico debido a la formación de sal de sodio (Parasrampuria y Gupta, 1990; Pisal et al., 2014). Además, la temperatura aumenta la cinética de la interacción cromatográfica, lo que implica la disminución o aumento significativo del tiempo de retención.

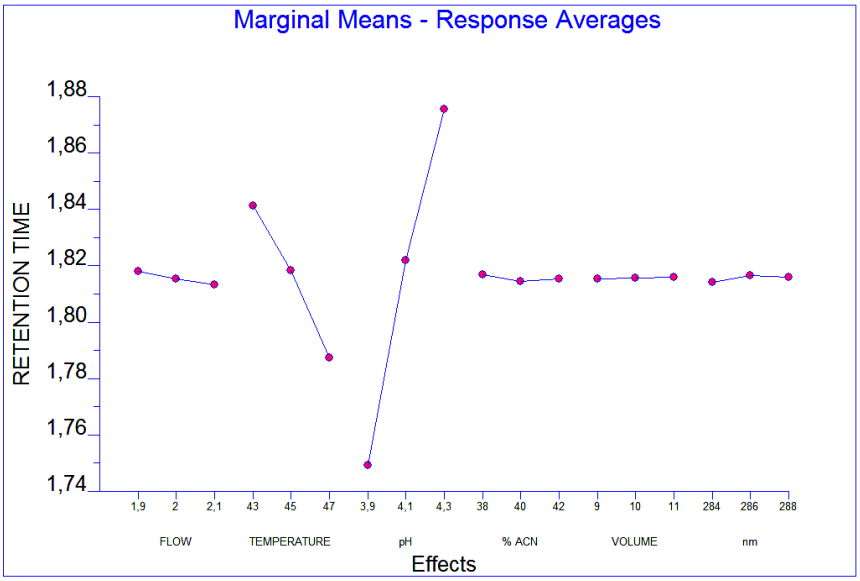


Figura 35. Gráfica de las medias marginales sobre la respuesta promedio del tiempo de retención ACZ.

- ***Área bajo la curva (AUC) del pico***

Según ANOM (Anexo II) todos los factores ejercieron una influencia significativa sobre el valor del área bajo la curva, siendo la longitud de onda el factor con mayor influencia en el pico, dato corroborado con el ANOVA (86,9% de contribución) que puede observarse representado en la Figura 36. Este efecto se puede explicar ya que la longitud de onda a la que se está detectando la muestra en ACZ no corresponde a $\lambda_{máx}$.

Presenta un efecto principal negativo al pasar del nivel bajo al alto (284-288), por lo que al aumentar la longitud de onda 2 nm disminuye el área del pico (Figura 37). Tanto es así que se podría concluir que la longitud de onda constituye un punto crítico a considerar cuando se haga la transferencia tecnológica del presente método, la cual se fijó en 286 nm durante el estudio de validación.

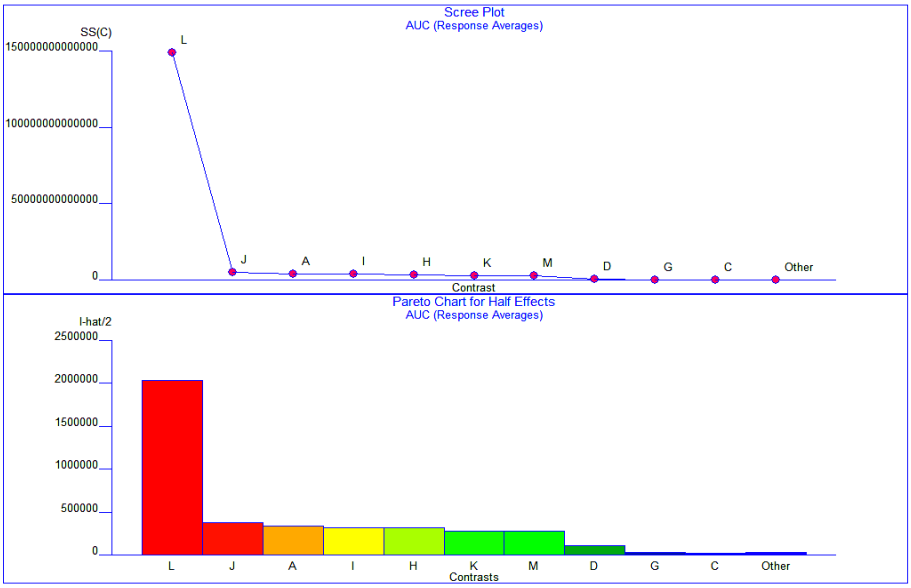


Figura 36. Gráficas Scree plot y Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta área bajo la curva ACZ. A: Flujo; B: Temperatura horno; E: pH fase móvil; I: % ACN; J: Volumen inyección; L: longitud de onda.

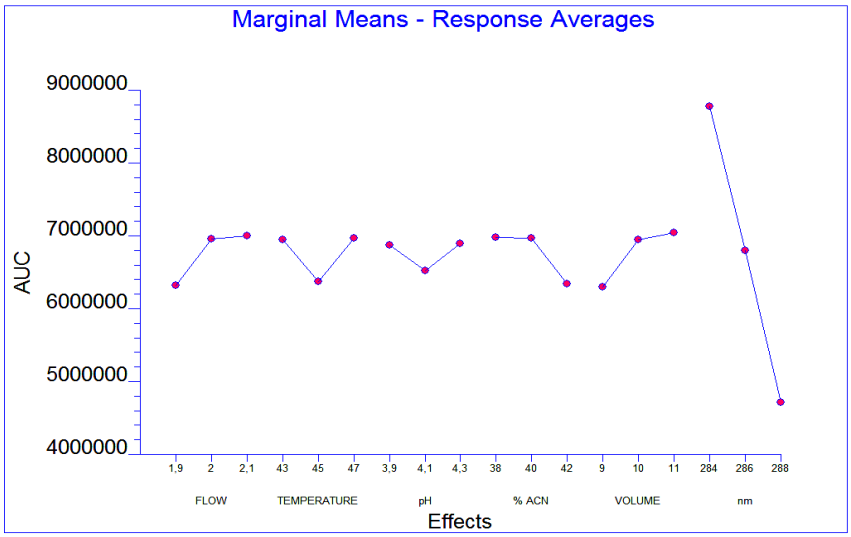


Figura 37. Gráfica de las medias marginales sobre la respuesta promedio del área bajo la curva de ACZ.

4.2.7.2. Robustez para TM

- ***Tiempo de retención***

Para TM, ANOM muestra que, aunque a simple vista todos los factores presentan el mismo porcentaje de contribución e influirían con la misma magnitud (Figura 38), el ANOVA (p = 0,499) mostró que estas posibles influencias en términos de sus factores y niveles no son estadísticamente significativas, con un 95% de confianza. El porcentaje de contribución de cada factor a la variabilidad no superó el 4%, por lo que los factores no influyeron (Figura 39).

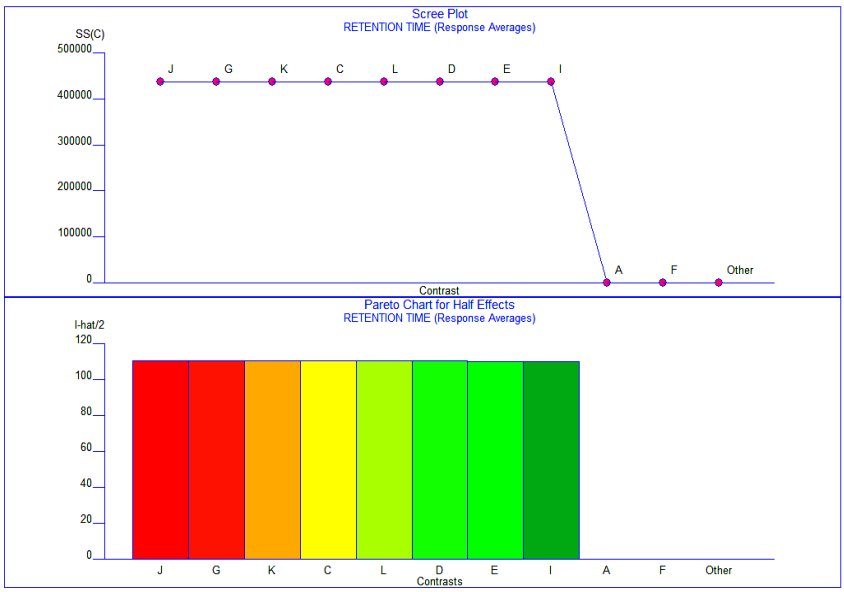


Figura 38. Gráficas Scree plot y Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención de TM. A: Flujo; B: Temperatura horno; E: pH fase móvil; I: % ACN; J: Volumen inyección; L: longitud de onda.

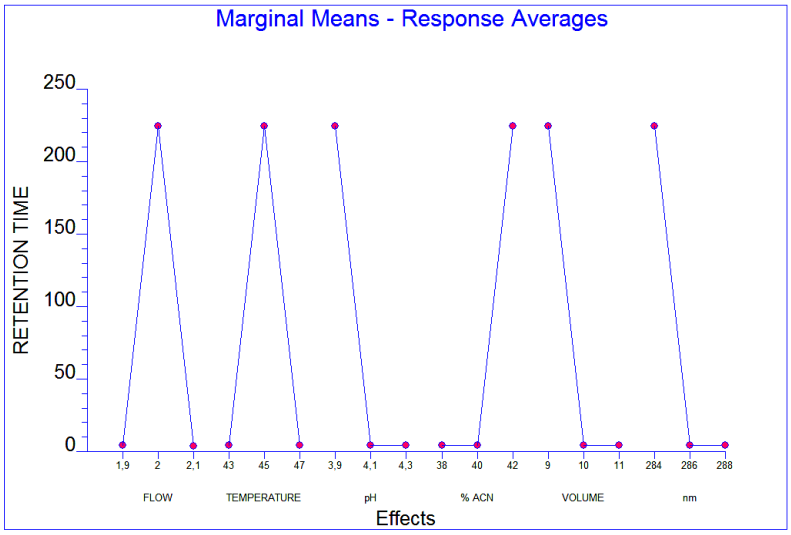


Figura 39. Gráfica de las medias marginales sobre la respuesta promedio del tiempo de retención de TM.

- ***Área bajo la curva (AUC) del pico***

Según el análisis ANOM complementado con ANOVA, todos los factores estudiados exceptuando el porcentaje de ACN afectaron al área del pico de TM apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados ($p < 0,001$). De todos ellos, tres factores son los que hay que considerar con mayor énfasis en su control: el flujo (14%), el volumen de inyección (64%) y la longitud de onda (19%), como se expone en la Figura 40. Por otra parte, el gráfico de medias marginales (Figura 41) permitió evaluar el efecto principal negativo que tiene el flujo frente al efecto positivo que tienen los factores volumen de inyección y longitud de onda, cuando pasan del nivel inferior al superior. Este comportamiento se puede explicar dado que el efecto de aumentar el flujo en la zona de gradiente conlleva una disminución del ancho del pico y, por tanto, el área bajo la curva es menor. Así mismo, se puede explicar que la longitud de onda tenga un efecto positivo, ya que como el método se desarrolló a 286 nm, al aumentar la longitud de onda nos acercamos a la $\lambda_{máx}$ de TM (295 nm) corroborada también por otros autores; al aumentar la altura del pico, implicaría un aumento del área del mismo (Moffat et al., 2011). Finalmente, el volumen de inyección posee, como es lógico, un efecto positivo, ya que al inyectar mayor cantidad de volumen, aumenta la respuesta generada.

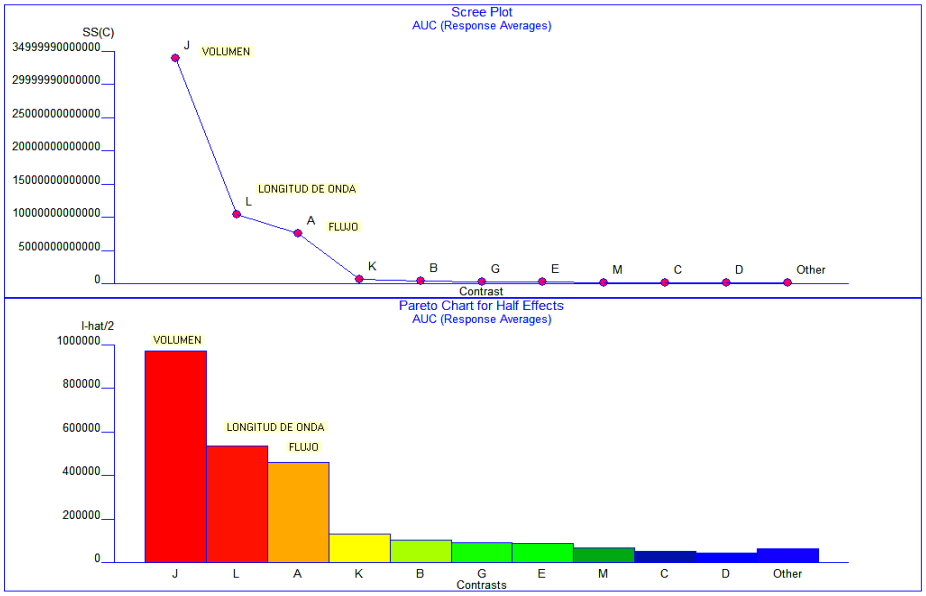


Figura 40. Gráficas Scree plot y Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta área bajo la curva de TM. A: Flujo; B: Temperatura horno; E: pH fase móvil; I: % ACN; J: Volumen inyección; L: longitud de onda.

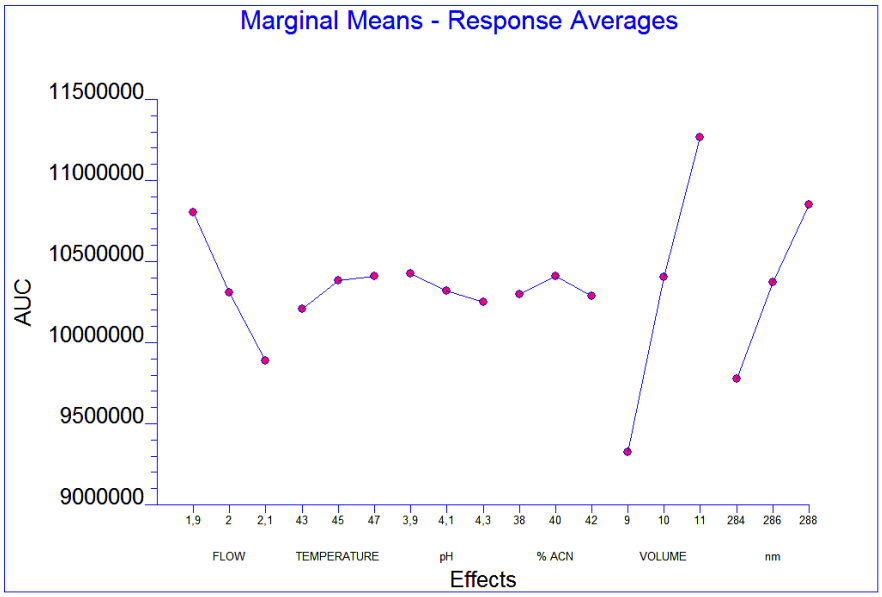


Figura 41. Gráfica de las medias marginales sobre la respuesta promedio del área bajo la curva TM.

El estudio de robustez se llevó a cabo para analizar la influencia de las condiciones cromatográficas del método en los resultados que derivan de éste. A modo de resumen, los factores críticos que se han detectado en el caso de ACZ fueron el pH de la fase móvil y la temperatura respecto a su tiempo de retención, siendo la longitud de onda el factor con mayor influencia en la zona del pico para el área bajo la curva. Para el TM, ningún factor influyó significativamente en el tiempo de retención de éste; sin embargo, todos los factores estudiados exceptuando el porcentaje de ACN afectaron al área del pico, destacando el flujo, el volumen de inyección y la longitud de onda. Con estas consideraciones sobre los puntos críticos del método, se puede justificar la gran influencia de los factores y los respectivos niveles de análisis de variabilidad considerando que este desarrollo cromatográfico no fue isocrático. Por tanto, la condición de robustez del método analítico se logró fijando la temperatura a 45 °C, pH igual a 4,1, longitud de onda de 286 nm, un volumen de inyección de 10 µL y velocidad de flujo a 2 mL/min.

4.3. APLICACIÓN DE LA CALIDAD POR DISEÑO EN EL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

Una vez desarrollado y validado el método analítico, que permitiese cuantificar TM y ACZ de forma simultánea, y haber analizado el comportamiento de los fármacos respecto a las vesículas fijando ACZ en la fase acuosa, TM en fase oleosa, que han permitido seleccionar TLE como la técnica de elaboración que proporciona las vesículas con las mejores características para nuestro fin y que se ha comprobado mediante estudios de liberación y permeación *in vitro* el potencial de las vesículas con los fármacos como potenciadores de la permeación, se aplicó QbD para obtener una formulación optimizada conociendo los parámetros críticos de calidad y del proceso, así como el espacio de diseño donde la formulación fuese segura y efectiva.

4.3.1. Diseño Plackett-Burman (PB12)

Este ensayo de cribado se llevó a cabo aplicando el diseño factorial fraccionado de Plackett y Burman PB12 mediante el cual se evaluaron ocho factores (cantidad de PC, CH, Deo-Na, % etanol incorporado, relación metanol/cloroformo, proceso de hidratación, tiempo de hidratación y extrusión) a dos niveles con el fin de conocer cuál de ellos influyó

significativamente en la optimización de las cualidades críticas del producto (respuestas): PdE, tamaño vesicular, IP y PZ. Los resultados procedentes de la caracterización de los lotes procedentes de la matriz PB12 (Tabla 7, ver apartado 3.6.1) se analizaron estadísticamente con el software STATGRAPHICScenturionXVIv. 16.1.17. La Tabla 25 recoge los resultados.

Lote	PdE_{ACZ} (%)	PdE_{TM} (%)	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)
1	19,0 ± 2,6	13,1 ± 0,7	240,0 ± 45,0	0,208 ± 0,03	31,7 ± 10,1
2	14,8 ± 1,7	27,8 ± 1,4	644,0 ± 27,6	0,214 ± 0,01	9,5 ± 2,9
3	20,4 ± 1,1	14,3 ± 1,6	326,2 ± 7,9	0,395 ± 0,09	30,5 ± 7,1
4	12,4 ± 0,7	31,2 ± 2,8	692,9 ± 10,4	0,578 ± 0,10	10,5 ± 1,8
5	11,4 ± 1,3	29,8 ± 6,6	626,3 ± 17,4	0,14 ± 0,03	9,8 ± 2,9
6	20,8 ± 2,9	20,5 ± 0,9	298,4 ± 9,1	0,272 ± 0,07	24,8 ± 11,1
7	11,2 ± 3,5	41,2 ± 2,2	773,3 ± 54,3	0,736 ± 0,15	11,5 ± 1,5
8	19,2 ± 7,6	13,3 ± 1,4	166,6 ± 5,6	0,127 ± 0,01	30,0 ± 9,8
9	10,2 ± 3,6	44,0 ± 4,3	752,4 ± 12,9	0,251 ± 0,09	12,9 ± 3,2
10	28,3 ± 1,5	25,1 ± 2,1	648,9 ± 29,0	0,155 ± 0,04	10,9 ± 1,8
11	6,7 ± 4,1	5,7 ± 1,2	148,0 ± 33,1	0,16 ± 0,04	34,3 ± 10,5
12	8,3 ± 2,5	6,5 ± 3,1	149,5 ± 13,2	0,168 ± 0,08	34,3 ± 8,7

Tabla 25. Resultados obtenidos de PB12 Diseño. Donde PdE_{ACZ}: porcentaje de encapsulación de ACZ, PdE_{TM}: porcentaje de encapsulación de TM, IP: Indice de Polidispersión, PZ: Potencial Zeta.

4.3.1.1. Porcentaje de encapsulación

Para TM, el factor evaluado que demostró tener influencia estadísticamente significativa fue el proceso de extrusión ($p = 0,006$) (Figura 42). Tiene un efecto principal positivo sobre el porcentaje de encapsulación cuando se pasa del nivel bajo (extruido) al nivel alto (no extruido). Este efecto es lógico, ya que, al no extruir, el tamaño de los liposomas es mayor, lo que implica un aumento en el valor de este parámetro. Por tanto, este factor se definió como parámetro crítico de calidad.

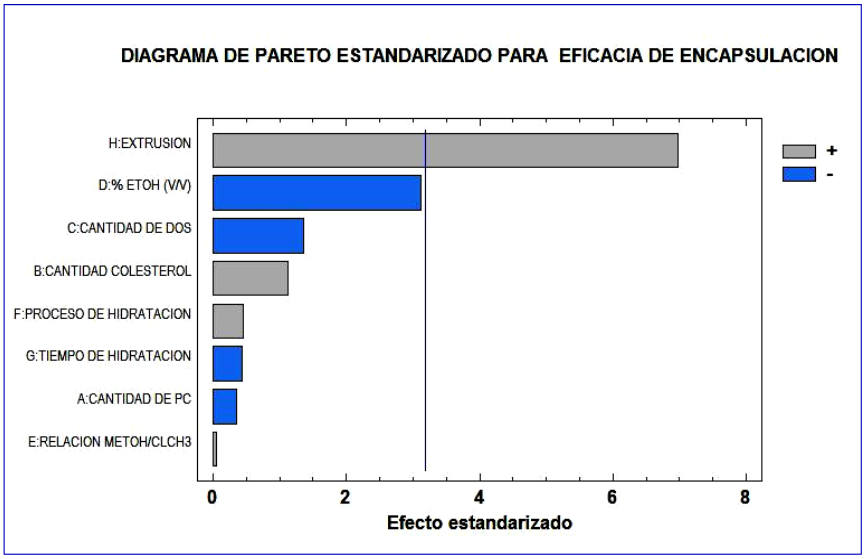


Figura 42. Diagrama de Pareto estandarizado para el PdE de TM (generado por el software STATGRAPHICScenturionXVI).

Sin embargo, el ANOVA, cuyo p fue superior a 0,05, reveló que ningún factor afectó significativamente la confianza del 95% en la variabilidad del PdE de ACZ. Como se puede observar en la Figura 43, a pesar de que ninguna variable influyó estadísticamente, se obtiene que el proceso de hidratación tuvo un efecto negativo sobre la eficacia de encapsulación al pasar de ser un proceso dinámico a estático.

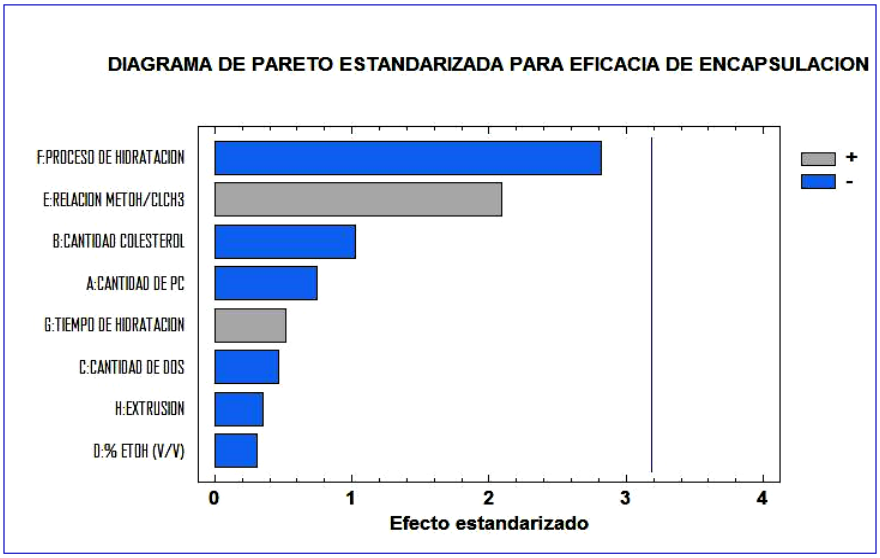


Figura 43. Diagrama de Pareto estandarizado para el PdE de ACZ (generado por el software STATGRAPHICScenturionXVI).

4.3.1.2. Tamaño vesicular

Analizando el diagrama de Pareto presentado en la Figura 44, pudo observarse que el factor de extrusión y el porcentaje de etanol añadido a la fase acuosa afectaron significativamente a la variabilidad del tamaño vesicular, obteniéndose mediante ANOVA un valor de p = 0,0026 para el porcentaje de disolvente incorporado y el valor p = 0,00001 para la extrusión. La gráfica mostró que el efecto del porcentaje de etanol sobre las dimensiones de las vesículas fue negativo, de modo que, al aumentar su porcentaje, el tamaño vesicular disminuye. Como lo demuestran diferentes autores, la justificación se basa en las propiedades polares del etanol, que permiten una mejor interacción y compactación de los componentes lipídicos, haciendo que la membrana formada sea más compacta, resistente y aumentando su superficie de contacto (Hirsjärvi et al., 2010). Además, este disolvente también contribuye a disminuir la carga dieléctrica de la solución tampón, estabilizando termodinámicamente los liposomas mediante una disminución de su tamaño para que exista menos entropía en la dispersión (Hirsjärvi et al., 2012).

Por su parte, el factor extrusión presentó un efecto positivo ya que, obviamente, si la muestra no está extruida, tanto el tamaño como el índice de polidispersión aumentan considerablemente.

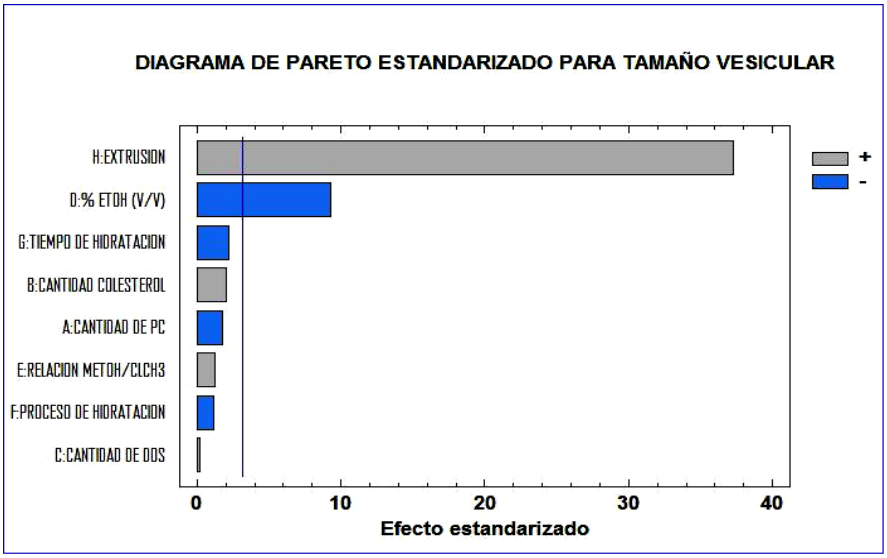


Figura 44. Diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño vesicular de los liposomas deformables (generado por el software STATGRAPHICScenturionXVI).

4.3.1.3. Potencial Zeta

Finalmente, la extrusión fue el único factor que afectó significativamente al potencial zeta (p = 0,0003), de modo que tuvo un efecto principal negativo cuando las vesículas no habían sido extruidas (Figura 45). Así se demostró que los liposomas de mayor tamaño conforman una superficie efectiva menor, la cual afecta directamente a la capa de Stern y difusa, disminuyendo su magnitud, provocando una mayor fuerza de atracción entre las vesículas y aumentando el grado de inestabilidad del sistema con su posterior agregación en el tiempo (Volodkin et al., 2007).

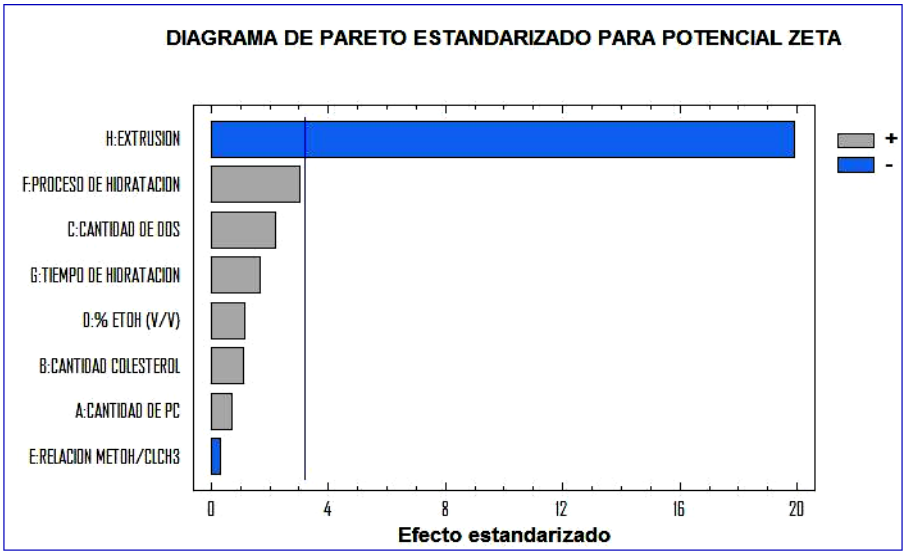


Figura 45. Diagrama de Pareto estandarizado para el potencial zeta de los transfersomas (generado por el software STATGRAPHICScenturionXVI).

Tras finalizar el estudio de cribado, se concluyó que existen dos factores que influyeron estadísticamente de manera positiva o negativa a las variables de respuesta analizadas: el factor extrusión y el factor porcentaje de etanol a los cuales los consideraremos factores o parámetros críticos de calidad, cuyos niveles es necesario controlar para conseguir una formulación óptima y segura.

A partir del presente estudio, se predijeron ecuaciones de regresión que se ajustaron a los datos de cada respuesta, las cuales quedan recogidas en la Tabla 25. Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales, excepto para los factores categóricos que toman valores de -1 para el nivel inferior y +1 para el nivel superior.

PdE_{TML} = 134,305 - 110,299·**PC** + 412,054·**CH** - 5663,43·**Deo-Na** - 62,2889·**EtOH** + 0,0783333·**MeOH/Cl_3CH** + 0,688333·**Hidr.** - 0,1075·**Tiempo** + 10,4683·**Extrusión**
PdE_{ACZ} = 86,9299 - 224,426· **PC** - 364,904· **CH** - 1872,4· **Deo-Na** - 5,86667· **EtOH**+ 3,025· **MeOH/Cl_3CH** - 4,08333· **Hidr** + 0,124444·**Tiempo** - 0,513333·**Extrusión**
Tamaño= 1592,0 - 2329,51·**PC** + 3167,28·**CH** + 2565,88·**Deo-Na** - 777,667·**EtOH** + 8,00833· **MeOH/Cl_3CH** - 7,29167·**Hidr.** - 2,34583·**Tiempo**+ 234,092·**Extrusión**
Potencial Zeta= -37,3923 + 73,7648·**PC** + 137,351·**CH** + 3074,43·**Deo-Na** + 7,6·**EtOH** - 0,153333·**MeOH/Cl_3CH** + 1,525·**Hidrat.** + 0,138333·**Tiempo** - 10,0417·**Extrusión**

Tabla 25. Ecuación de regresión para cada respuesta. PC: mmoles fosfatidilcolina, CH: mmoles de colesterol, Deo-Na: mmoles de desoxicolato sódico, EtOH: % de Etanol, MeOH/Cl_3CH: Relación metanol/cloroformo, Hidr: Tipo de hidratación, Tiempo: Tiempo de hidratación.

4.3.2. Etapa de optimización

En esta etapa de optimización se pretende obtener una formulación que presente las mejores características para una posterior administración oftálmica en el tratamiento del glaucoma. Para ello, se aplicó el *Quality by Design* con el fin de optimizar la fórmula de los liposomas deformables. El espacio de diseño se estableció a través de una tabla de contraste basada en los efectos principales del análisis estadístico en el diseño PB12. El nivel de cada factor se seleccionó para maximizar la eficacia de encapsulación, minimizar el tamaño vesicular y maximizar el potencial zeta. Visto que los únicos factores estadísticamente significativos fueron la extrusión y el porcentaje de etanol, y que el comportamiento de los factores a sus respectivos niveles para maximizar o minimizar las respuestas, son en su mayoría similares para ACZ y TM, se generaron dos formulaciones optimizadas que se recogen en la Tabla 26.

PA	Factores								Respuesta
	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	
ACZ	-	-	-	-	+	-	+	-	**PdE**
TML	-	+	-	-	+	+	-	+	**PdE**
Ambos	+	-	+	+	-	+	+	-	**Tamaño**
	+	+	+	+	-	+	+	-	**PZ**

Tabla 24. Tabla de optimización por contrastes, Fijación de niveles a cada factor. Donde A: Fosfatidilcolina, B: Colesterol, C: Desoxicolato sódico, D: Etanol, E: MeOH/Cl_3CH, F: Tipo de hidratación, G: Tiempo de hidratación, H: Extrusión. (+) Máxima respuesta, (-): Mínima respuesta.

En este estudio, la influencia del etanol resultó estadísticamente significativa sobre el tamaño; por ello se decidió incorporar 1,5 % del solvente en la formulación. Sin embargo, el proceso de extrusión influyó de forma significativa en todas las respuestas, por lo que se procedió a elaborar dos formulaciones cuya única diferencia radicó en sí o no extrusión.

Los ensayos confirmatorios de las fórmulas definidas en la Tabla 27 se llevaron a cabo elaborándolas con dichas condiciones y caracterizándolas posteriormente en cuanto a eficacia de encapsulación, tamaño vesicular, potencial zeta y cinética de permeación. Cabe resaltar que la única diferencia entre ambas formulaciones fue el proceso de extrusión. Los resultados finales obtenidos y las variables de respuesta analizadas del estudio de permeación y el factor de similitud a las dos formulaciones se muestran en la Tabla 27, mientras que las cinéticas de permeación se exponen en las Figuras 46 y 47.

	Factores							
	PC (mols)	**CH (mols)**	**Deo-Na (Mols)**	**EtOH (% v/v)**	**MetOH/$CHCl_3$ Ratio**	**Mp**	**Mt (min)**	**Extrusión**
FM1	0,0954	0,0812	0,00724	1,5	0,73	Estático	30	Sí
FM2	0,0954	0,0812	0,00724	1,5	0,73	Estático	30	No

Tabla 26. Formulación optimizada, factores y niveles. PC: fosfatidilcolina; CH: colesterol; Deo-Na: co - tensioactivo; Mp: proceso de hidratación; Mt: tiempo de hidratación.

	PdE_{ACZ} (%)	PdE_{TML} (%)	Tamaño (nm)	PZ (mV)	$f_{2\ ACZ}$	$f_{2\ TML}$	J_{ACZ}	J_{ACZ}
FM1	9,23 ± 1,47	5,63 ± 2,54	149,70 ± 59,71	24,26 ± 8,92	51,32	48,37	3,41E-4	2,7E-4
FM2	22,03 ± 2,53	29,66 ± 3,12	385,92 ± 65,63	30,81 ± 11,30			2,8E-4	2,03E-4

Tabla 27. Resultados de la formulaciones optimizadas.

En base a los resultados, se puede concluir que la formulación FM2 correspondiente al lote no extruido presentó una eficacia de encapsulación del 22,03% para ACZ frente al 9,23% de FM1, y del 30% para TM frente al 6% de FM1. El tamaño vesicular medio de FM2 fue de 386 nm, 2,5 veces mayor al tamaño vesicular de FM1, resultado lógico tras ser sometido al proceso de extrusión. El potencial zeta que presentó FM2 fue de -31mV, que es un 27% mayor al potencial de FM1. Finalmente, al realizar el factor de similitud entre los perfiles de permeación se obtuvo un f2 = 51 para ACZ y f2 = 48 para TM. Recordando que un factor de similitud igual o superior a 50 es indicativo de que existe una diferencia hasta del 10% entre los perfiles, lo que implica similitud de la cinética de permeación, ello nos permitió definir que la cinética de permeación de la formulación 1 y la formulación 2 eran equivalentes para la ACZ y TM. Además, como se pudo observar en las gráficas, al comparar el comportamiento de permeación de los activos y a través de un análisis de sus pendientes para obtener valores de coeficiente de permeabilidad (P) y flujo (J), se concluyó que, tanto para ACZ como para TM, existe una diferencia significativa en la cinética de permeación de los activos, del 18% y 26% respectivamente, desde la formulación que los contiene hacia el medio receptor, siendo mayor su magnitud para la FM1 que FM2, debido a que FM1 está constituida por liposomas de menor tamaño vesicular, los cuales permean más fácilmente a través de la membrana, que FM2, la cual contiene vesículas que no han sido extruidas ni homogeneizadas. Esto conlleva un retardo del flujo de permeación, el mismo que a su vez resulta beneficioso, dado que lo que se pretende es una prolongación en el tiempo de liberación de los activos.

Se obtuvo con el estudio Calidad por Diseño que la formulación FM2 presentó una eficacia de encapsulación de 22,03 ± 2,53 y 29,66 ± 3,12 para ACZ y TM, respectivamente, un tamaño medio de 385,92 ± 65,6 nm, un

potencial zeta de -30,8 ± 11,3 mV, un valor f2 de 51,32 y 48,37 para ACZ y TM y un flujo de permeación de 2,8E-4 mg/cm^2/h. En definitiva, con los presentes estudios realizados, se concluye que la formulación FM2 presenta el mejor perfil de calidad (PPQ) deseado para el QbD.

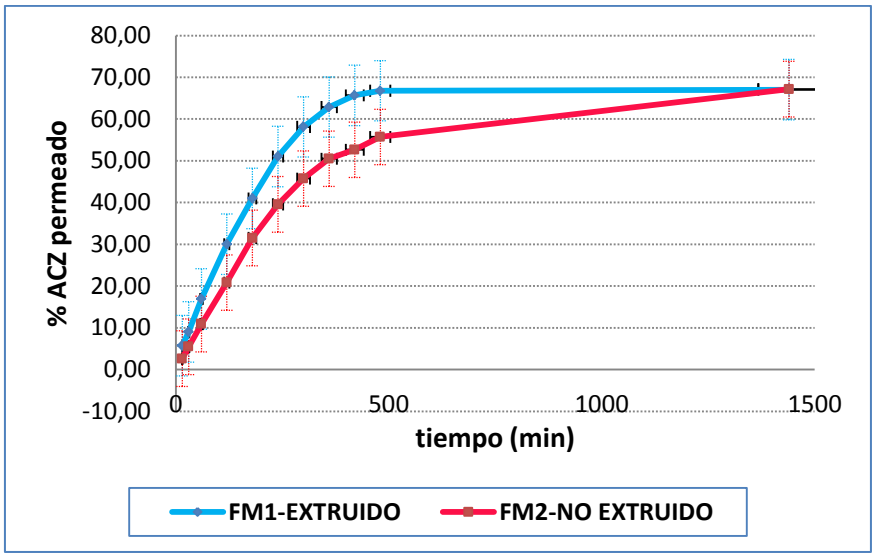


Figura 46. Gráfica de permeación de ACZ en la optimización de la fórmula.

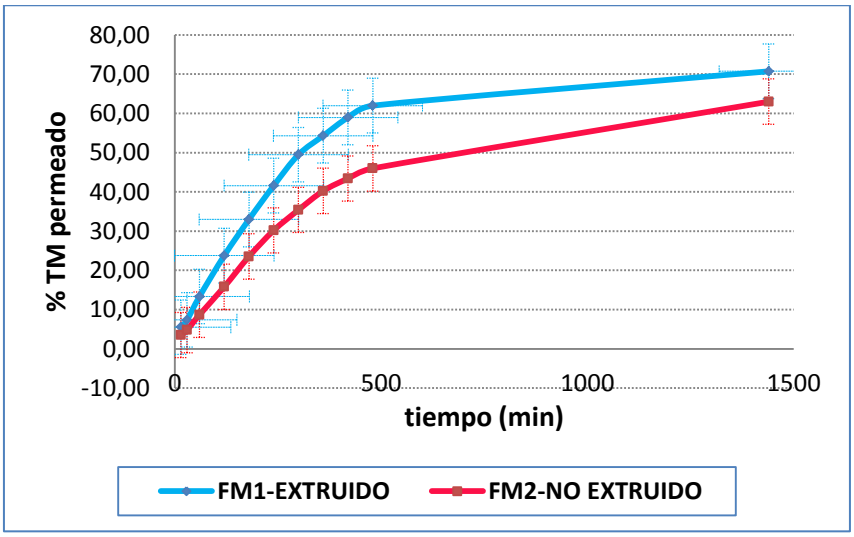


Figura 47. Gráfica de permeación de TM en la optimización de la fórmula.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo, tras el desarrollo del método analítico mediante HPLC de fase inversa y condiciones de gradiente, fue posible cuantificar la cantidad de ACZ y TM encapsulados en liposomas deformables para una posible administración oftálmica. La validación desarrollada bajo las directrices ICH, nos permitió evaluar los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, LOQ y LOD. De acuerdo con los resultados, esta fase de validación nos proporcionó información sobre la calidad y reproducibilidad del método propuesto. Además, el estudio realizado bajo los criterios de robustez estadística en el enfoque de Taguchi nos permitió identificar las condiciones cromatográficas óptimas (ACN = 40%, fase móvil pH = 4,1, longitud de onda = 286 nm, temperatura = 45 °C). Debido a la naturaleza de este método analítico en gradiente, tanto la composición de la fase móvil como los parámetros de flujo tuvieron una influencia estadísticamente significativa, por lo que debemos incluirlos como factores críticos para asegurar resultados fiables.

En la etapa de formulación, se realizaron algunos estudios previos, de los cuales se concluyó que:

1. De todas las técnicas de elaboración ensayadas para la fabricación de los liposomas, la que proporcionó mejores respuestas en cuanto a tamaño vesicular, índice de polidispersión, estabilidad física y eficacia de encapsulación de ambos principios activos fue el método de evaporación en capa fina (TLE). Mediante esta técnica se han obtenido las vesículas más pequeñas y con mayor homogeneidad de tamaño. Además, la cantidad de fármaco encapsulado fue superior.

2. Con respecto a la ubicación de los fármacos en los compartimentos de los liposomas, los estudios realizados acerca de la eficacia de encapsulación de ambos activos muestran cómo la incorporación de ACZ en la fase acuosa y TM en la fase oleosa de las vesículas, proveen una mayor reproducibilidad interlote así como mejores eficacias de encapsulación.

3. En cuanto al potencial zeta, se han obtenido valores negativos en todos los lotes, como cabría esperar, debido a la presencia de Deo-Na como activador de borde, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre las formulaciones. La obtención de valores en torno a -35 mV permite asumir la estabilidad del sistema.

4. En el estudio de liberación de los principios activos se evidencia claramente el efecto modulador de todas las formulaciones de liposomas. En cuanto a la liberación del TM, se concluye que no hay influencia del método de preparación utilizado, mientras que, para la ACZ, la formulación TLE muestra una liberación más lenta. La difusión es el mecanismo de liberación de los fármacos desde el interior del transfersoma.
5. En cuanto al ensayo de permeación, los transfersomas fueron embebidos en el gel de Carbopol® 940 que permitió aumentar el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular. Sin embargo, dificultó la permeación de los fármacos siendo más notable en el caso del fármaco con carga positiva, TM. Se puede concluir al respecto que la permeación se ve influenciado principalmente por el tamaño de las vesículas más que por el método utilizado para su elaboración. No obstante, hay que considerar que la fracción no encapsulada del fármaco puede tener un efecto positivo en la permeación, mayoritariamente en las etapas iniciales del proceso.
6. El análisis térmico de los componentes de los liposomas arrojó como resultado una interacción entre principios activos y compuestos anfifílicos como la PC y el Deo-Na.

Tras la validación y estudios preliminares, la aplicación de los principios de Calidad por Diseño en el presente estudio mejoró la comprensión del proceso de formulación e implementación de liposomas deformables cargados con ACZ y TM. Con la ayuda del diseño experimental (Plackett-Burman), se procedió a realizar un cribado para identificar los atributos críticos de calidad y los puntos críticos del proceso, lo que nos permitió establecer un diseño optimizado de fórmula y espacio basado en maximizar la eficacia de encapsulación, el potencial zeta y permeación y minimizando el tamaño vesicular. Se concluye así que existen dos factores que influyen positiva o negativamente en las variables de respuesta analizadas: el factor de extrusión y el factor % etanol, que serán considerados factores críticos de calidad o parámetros críticos de calidad, cuyos niveles deben ser controlados para lograr una relación óptima y una formulación segura. Finalmente, la formulación optimizada mostró las siguientes características: eficacia de encapsulación: ACZ = 22,03 ± 2,53%, TM = 29,66 ± 3,12%, tamaño vesicular:

385,92 ± 65,6 nm, potencial zeta: - 30,8 ± 11,3 mV, flujo de permeación: $3,41x10^{-4}$ y $2,74x10^{-4}$ mg/cm^2/h para ACZ y TM, respectivamente. Además, se encontró que los perfiles de permeación entre las dos formulaciones, el factor de similitud era ≈ 50, concluyendo así que FM2 presentaba las características deseadas para preparar liposomas deformables para características de administración oftálmica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. Int J Pharm. 2005;290(1):155-159.

Aggarwal D, Pal D, Mitra AK, Kaur IP. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. Int J Pharm. 2007;338(1):21-26.

Ahad A, Aqil M, Kohli K, Sultana Y, Mujeeb M. Enhanced transdermal delivery of an anti-hypertensive agent via nanoethosomes: statistical optimization, characterization and pharmacokinetic assessment. Int J Pharm. 2013;443(1):26-38.

Álvarez R. Comparación de dos proporciones: Estadística no paramétrica. En: Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Díaz de Santos, Madrid, pp. 763-770 (2007a).

Álvarez R. Comparación de dos proporciones: pruebas paramétricas. En: Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Díaz de Santos, Madrid, pp. 357-373 (2007b).

Álvarez R. Distribuciones de variables aleatorias continuas: normal, t de Student, chi-cuadrado, f de Snedecor. En: Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Díaz de Santos, Madrid, pp. 187-217 (2007c).

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res. 1995;12(3)413-420.

Ardakani MK, Wulff SS. An overview of optimization formulations for multiresponse surface problems. Qual Reliab Eng Int. 2013;29(1):3-16.

Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. Int J Pharm. 2008;355(1):307-313.

Baklayan GA, Collins EC, Thetford T, Soriano A, Song CK, Han J. Evaluation of aqueous humor concentrations of Istalol® and Betimol® following a single ocular instillation in rabbit eyes. J Ocul Pharmacol Ther. 2088;24(5):507-512.

Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, Diamox. Am J Ophthalmol. 1954;37:13-15.

Bhanja S, Ellaiah P, Martha SK, Sahu PK, Tiwari SP, Panigrahi B, Das D. Formulation and in vitro evaluation of mucoadhesive buccal tablets of timolol maleate. Int J Pharm Biomed Res. 2010;1(4):129-134.

Box GE, Hunter WG, Hunter JS. Diseños factoriales a dos niveles. En: Estadística para investigadores: Diseño, Innovación y descubrimiento. Reverté, Barcelona, pp. 173-222 (2008).

Calissendorff B, Maren N, Wettrell K, Östberg A. Timolol versus pilocarpine separately or combined with acetazolamide: effects on intraocular pressure. Acta Ophthalmol. 1980;58(4):624-631.

Castile JD, Taylor KM. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. Int J Pharm. 1999;188(1):87-95.

Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, Wu W. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. Int J Pharm. 2009;376(1):153-160.

Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. Pharm Sci Technol Today. 1999;2:311-320.

Coakes RL, Brubaker RF. The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure: in the normal eye. Arch Ophthalmol. 1978;96(11):2045.

Costa P, Sousa JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur J Pharm Sci. 2001;13(2):123-133.

Cózar-Bernal MJ, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Development and validation of a high performance chromatographic method for determining sumatriptan in niosomes. J Pharm Biomed Anal. 2013;72:251-260.

Dailey RA, Brubaker RF, Bourne WM. The effects of timolol maleate and acetazolamide on the rate of aqueous formation in normal human subjects. Am J Ophthalmol. 1982;93(2):232-237.

Desu MM, Raghavarao D. Procedure for two samples independent. En: Nonparametric statistical methods for complete and censored data. CRC Press, Florida, pp. 63-100 (2004).

Everitt DE, Avorn J. Systemic effects of medications used to treat glaucoma. Ann Intern Med. 1990;112(2):120-125.

Ginés JM, Veiga MD, Arias MJ, Rabasco AM. Elaboration and thermal study of interactions between cinnarizine and gelucire® 5310 physical mixtures and solid dispersions. Int J Pharm. 1995;126(1-2):287-291.

González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Rabasco AM. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. Drug Dev Ind Pharm. 2016;42(10):1683-1694.

González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-Rodríguez PL, Rabasco AM. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. Int J Pharm. 2007;337(1):336-345.

Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. Int J Pharm. 2005;306(1-2):71-82.

Gupta S, Vyas SP. Carbopol/Chitosan based pH triggered in situ gelling system for ocular delivery of timolol maleate. Scientia pharmaceutica. 2010;78(4):959.

Hansch C, Leo A, Elkins D. Partition coefficients and their uses. Chemical reviews. 1995;71(6):525-616.

Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Sevillano-Cabeza A. Determination of acetazolamide in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the presence of xanthines. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1992;582(1):181-187.

Higashiyama M, Inada K, Ohtori A, Tojo K. Improvement of the ocular bioavailability of timolol by sorbic acid. Int J Pharm. 2004;272(1):91-98.

Hirsjärvi S, Bastiat G, Saulnier P, Benoît JP. Evaluation of surface deformability of lipid nanocapsules by drop tensiometer technique, and its experimental assessment by dialysis and tangential flow filtration. Int J Pharm. 2012;434(1-2):460-467.

Hirsjärvi S, Qiao Y, Royere A, Bibette J, Benoit JP. Layer-by-layer surface modification of lipid nanocapsules. Eur J Pharm Biopharm. 2010;76(2):200-207.

Hund E, Vander Heyden Y, Haustein M, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs. J Chromatogr A. 2000;874(2):167-185.

ICH Q2 R1: ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Methods: Text and Methology. 2005.

ICH Q8R2: ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development: Methodology. 2009.

Jahanshahi M, Sanati MH, Babaei Z. Optimization of parameters for the fabrication of gelatin nanoparticles by the Taguchi robust design method. J Appl Stat. 2008;35(12):1345-1353.

Kass MA, Korey M, Gordon M, Becker B. Timolol and acetazolamide: a study of concurrent administration. Arch Ophthalmol. 1982;100(6):941.

Kass MA. Efficacy of combining timolol with other antiglaucoma medications. Surv Ophthalmol. 1983;28:274-279.

Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. Int J Pharm. 2004;269(1):1-14.

Kaur IP, Singh M, Kanwar M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. Int J Pharm. 2000;199(2):119-127.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. Int J Pharm. 2002;248(1):1-14.

Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. Drug Dev Ind Pharm. 2002;28(4):353-369.

Krier F, Brion M, Debrus B, Lebrun P, Driesen A, Ziemons E, Hubert P. Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. J Pharm Biomed Anal. 2011;54(4):694-700.

Kulkarni SP, Amin PD. Stability indicating HPTLC determination of timolol maleate as bulk drug and in pharmaceutical preparations. J Pharm Biomed Anal. 2000;23(6):983-987.

Lawrence XY. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. Pharm Res. 2008;25(4):781-791.

Lehr CM, Lee YH, Lee VH. Improved ocular penetration of gentamicin by mucoadhesive polymer polycarbophil in the pigmented rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:2809–2814.

Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. Pharmaceutical experimental design. CRC Press 1998.

Lionberger R, Lawrence S, Lee L, Raw A, Yu L. Quality by design: concepts for ANDAs. The AAPS J. 2008;10(2):268-276.

López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int J Pharm. 2005;298(1):1-12.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. New “drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes” formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. Int J Pharm. 2010;395(1):222-231.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int J Pharm. 2006;312(1):53-60.

Maestrelli F, Capasso G, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. J Liposome Res. 2009;19(4):253-260.

Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Janoff AS. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. Biochim Biophys Acta. 1985;817(1):193-196.

Millard J, Álvarez-Núñez F, Yalkowsky S. Solubilization by cosolvents: establishing useful constants for the log-linear model. Int J Pharm. 2002;245(1-2):153-66.

Moffat A, Osselton D, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons. Pharmaceutical Press, London, pp. 818-2152. 2011.

Mohamed AMI, Abdel-Wadood HM, Mousa HS. Simultaneous determination of dorzolomide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. Talanta. 2014;130:495-505.

Moller H, Siewert M. FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products. Pharm Ind. 1995;57(5):362-369.

Moore JW. Mathematical comparison of dissolution profiles. Pharm Technol. 1996;20:64-75.

Mura P, Faucci MT, Manderioli A, Bramanti G, Ceccarelli L. Compatibility study between ibuproxam and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy1. J Pharm Biomed Anal. 1998;18(1-2):151-163.

Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. Eur J Pharm Biopharm. 2007;67(1):86-95.

Nasir F, Iqbal Z, Khan A, Ahmad L, Shah Y, Khan AZ, Khan S. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. J Chromatogr B. 2011;879(30):3434-3443.

Nethercote P, Ermer J. Calidad por diseño para métodos analíticos implicaciones para la validación y transferencia de métodos. Pharm Technol. 2013;10(6):17-19.

Parasrampuria J, Gupta VD. Development of oral liquid dosage forms of acetazolamide. J Pharm Sci. 1990;79(9):835-836.

Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. Chem Phys Lipids. 2014;177:8-18.

Pisal PB, Joshi MA, Padamwar MN, Patil SS, Pokharkar VB. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. Int J Pharm. 2014;461(1):82-88.

Richardson ES, Pitt WG, Woodbury DJ. The role of cavitation in liposome formation. Biophys J. 2007;93(12):4100-4107.

Romero CS, Lozano R. Caracterización fisicoquímica de un fármaco. En: Lozano M, Córdoba D, Córdoba M. Manual de tecnología farmacéutica. Barcelona, Elsevier, pp. 199-204. 2012.

Rongen HAH, Bult A, Van Bennekom WP. Liposomes and immunoassays. J Immunol Methods. 1997;204(2):105-133.

Sanghvi R, Narazaki R, Machatha SG, Yalkowsky SH. Solubility improvement of drugs using N-methyl pyrrolidone. AAPS Pharm Sci Tech. 2008;9(2):366-376.

Shah V, Skelly J, Barr W, Malinowski H, Amidon GL. Scale-up of controlled release products: preliminary considerations. Pharm Technol. 1992b;16(5):35-40.

Shah V, Yacobi A. In vitro and in vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms. Pharm Res. 1990;7(1):975-982.

Shah VP, Gurbarg M, Noory A, Dighe S, Skelly JP. Influence of higher rates of agitation on release patterns of immediate-release drug products. J Pharm Sci. 1992a;81(6):500-503.

Sharma N, Rao SS, Reddy AM. A novel and rapid validated stability-indicating UPLC method of related substances for dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in ophthalmic dosage form. J Chromatogr Sci. 2012;50(9):745-755.

Shedden A, Laurence J, Tipping R. Efficacy and tolerability of timolol maleate ophthalmic gel-forming solution versus timolol ophthalmic solution in adults with open-angle glaucoma or ocular hypertension: a six-month, double-masked, multicenter study. Clin Ther. 2001;23(3):440-450.

Singla AK, Kaur IP, Garg A, Aggarwal D. Novel approaches for topical delivery of acetazolamide. Pharm Technol. 2002;26(7):24-35.

Skoog D, Holler F, Nieman T. Métodos térmicos. En Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill, Madrid, pp. 864-877. 2001.

Taguchi, G. Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes. 1986.

Vander-Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. J Pharm Biomed Anal. 2001;24(5):723-753.

Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Ospino SCS, Rabasco Alvarez AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. Drug Dev Ind Pharm. 2010;36(6):666-675.

Volodkin D, Ball V, Schaaf P, Voegel JC, Mohwald H. Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. Biochim Biophys Acta. 2007;1768(2):280-290.

Wiedemann HG, Casagrande SF. Termomicroscopy. En: Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol 1, pp. 473-496. 1998.

Wolfhagen FHJ, Van Neerven JAFM, Groen FC, Ouwendijk RT. Severe nausea and vomiting with timolol eye drops. The Lancet. 1998;352(9125):373.

Wu H, Khan MA, Hussain AS. Process control perspective for process analytical technology: integration of chemical engineering practice into semiconductor and pharmaceutical industries. Chem Eng Commun. 2007;194(6):760-779.

Yamaguchi T, Nomura M, Matsuoka T, Koda S. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. Chem Phys Lipids. 2009;160(1):58-62.

CAPÍTULO III

Desarrollo de una formulación de liposomas deformables con ciclodextrinas, y niosomas para la co-administración de maleato de timolol y acetazolamida

INDICE CAPÍTULO III

INDICE DE FIGURAS CAPÍTULO III

INDICE DE TABLAS CAPÍTULO III

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha expuesto en el capítulo anterior, ACZ continúa siendo el fármaco más efectivo en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, sigue constituyendo un reto en investigación puesto que se requieren elevadas dosis orales para la disminución efectiva de la PIO y éstas se asocian con una amplia gama de efectos secundarios a nivel periférico que la mayoría de pacientes no pueden tolerar. Como se ha comentado previamente, esto es debido a la inexistencia de una formulación tópica como consecuencia de su baja solubilidad en agua (0,7 mg/mL) y de su bajo coeficiente de permeabilidad $4{,}1 \times 10^{-6}$ cm/s (Kaur et al., 2000).

Debido a la baja solubilidad de los derivados sulfonamidos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, se han desarrollado distintas técnicas de solubilización para intentar elaborar una formulación tópica eficaz. Una de las estrategias que se aplicó en la molécula de ACZ fue la de sintetizar sales, como la sal sódica, más soluble que ACZ, la cual presentaba un máximo de solubilidad a pH 9; sin embargo, se descubrió que a pH ≥ 8 existía una rápida tasa de degradación, manteniendo el máximo de estabilidad a un pH de 4-5. Por lo tanto, el desarrollo y la preparación de dichas formas más solubles de ACZ, sin tener en cuenta el pH, no sería conveniente si no llevara aparejado la realización de una preparación extemporánea (Parasrampuria y Das Gupta, 1989). Se ha demostrado que las formulaciones tópicas de ACZ en solución (como sal sódica), no han resultado exitosas por su limitada penetración ocular, lo que impide la presencia de una cantidad suficiente de fármaco en el cuerpo ciliar (Parasrampuria y Das Gupta, 1989; Khamis et al., 1993).

Cabe destacar las modificaciones químicas llevadas a cabo en la molécula con el fin de aumentar tanto la solubilidad como la permeabilidad; por su estructura química y por su alta liposolubilidad, ACZ es un buen candidato para crear análogos. Sin embargo, la gran mayoría de estos compuestos han sido descartados del arsenal terapéutico debido a las reacciones alérgicas producidas y a su baja eficacia en humanos (Graham et al., 1989). En este sentido, se utilizaron otras estrategias para aumentar la solubilidad en agua, como por ejemplo la introducción de grupos funcionales capaces de conseguir ese objetivo. Así, surgió dorzolamida, que fue el primer fármaco efectivo por vía tópica y el primero en ser aprobado por la FDA en 1995. Sin embargo, el uso tópico continuado de este fármaco causa molestias

oculares, lo cual es motivo de abandono del tratamiento en determinados pacientes (Silver, 1998).

A pesar de los continuos esfuerzos en sintetizar nuevos derivados solubles en agua, la potencia con que ACZ disminuye la PIO es inigualable con respecto al resto (Maus et al., 1997), por lo que en la actualidad se sigue investigando en este fármaco.

Durante el desarrollo de formulaciones tópicas se descubrió que las ciclodextrinas (CDs) eran capaces de formar complejos solubles en agua con moléculas que, sin complejar, serían muy poco solubles (Figura 1), como ACZ.

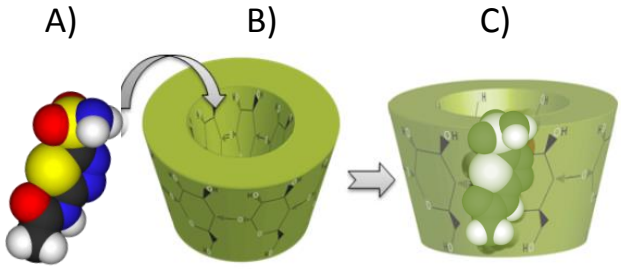


Figura 1. Representación de: A) ACZ (molécula apolar) B) Ciclodextrina. C) Complejo ACZ-CD.

(Modificado de: http://www.jotdown.es/wp-content/uploads/2016/02/Figura-3.png)

Otros problemas relacionados con la terapia ocular convencional, como el corto tiempo de residencia y la pérdida de fármaco a través del drenaje nasolacrimal ha llevado a muchos investigadores a explorar nuevos sistemas de administración tópica para este inhibidor de la anhidrasa carbónica (El-Menshawe, 2012). Así, los liposomas ya elaborados en capítulos anteriores encapsularían los fármacos hidrófilos en el núcleo acuoso, mientras que los activos hidrófobos formarían parte de la bicapa. Sin embargo, algunas de las moléculas lipofílicas atrapadas en la bicapa lipídica podrían interferir en la estabilidad de los liposomas (Alomrani et al., 2014), por lo que sería deseable intentar ubicarlos en el espacio acuoso. Con este objetivo, McCormack y Gregoriadis (1994) desarrollaron ya en la década de los 90 un nuevo complejo de fármaco-ciclodextrina encapsulado en liposomas. Las CDs tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con moléculas hidrófobas que

luego quedarían atrapadas en el centro acuoso de liposoma (Wanget al., 2016).

Por otro lado, las numerosas interacciones de la fosfatidilcolina con el resto de constituyentes de la formulación impulsan una tendencia a eliminarla de la formulación y a optar por otros nanotransportadores derivados de liposomas. Actualmente, numerosos científicos en todo el mundo están involucrados en el estudio de vesículas y estructuras coloidales como portadores para la administración de medicamentos (liposomas, nanopartículas, micelas y polímeros basados en nanodispositivos). Aunque los fosfolípidos son moléculas anfifílicas biodegradables y no tóxicas, surgen problemas en las aplicaciones prácticas de los liposomas, debido a la baja estabilidad física y química de las suspensiones acuosas de este tipo de vesículas. Por estas razones, moléculas anfifílicas como los tensioactivos no iónicos, se han estudiado como alternativa a los fosfolípidos (Marianecci et al., 2014), dando lugar a vesículas preparadas con tensioactivos no iónicos denominados niosomas (NS).

1.1. CICLODEXTRINAS

Podría afirmarse que la era de las CDs comenzó en 1981 cuando el científico francés Villiers observó cristales denominados “celulosina” durante la producción de dextrinas del almidón en un cultivo de la bacteria *Bacillus amylobacter* (Villiers, 1891). Villiers determinó la composición química y algunas propiedades químicas de los cristales desconocidos. Otra figura prominente en la ciencia de las CDs fue Schardinger, que a principios del siglo 20 aisló las bacterias responsables de la síntesis. Tan pronto como se reveló la estructura cíclica de las moléculas de CD, se propuso que éstas pudieran incluir moléculas en su interior.

Las CDs constituyen un grupo de productos naturales formados durante la digestión bacteriana del almidón. Se trata de oligosacáridos cíclicos constituidos por seis, siete y ocho unidades de D-(+)-glucopiranosa unidas por enlaces α (1, 4) dando lugar a α-, β- y γ-CD, respectivamente. Las CDs tienen estructuras bastante rígidas estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del carbono en posición 2 y 3, y carecen de rotación en el enlace α (1-4). La importancia de esta estructura radica en que esta disposición de los monómeros es la responsable de su conformación toroidal (cono truncado) (Figura 2), que delimita una cavidad relativamente

apolar de carácter hidrofóbico formada por los carbonos hidrofóbicos de los monómeros de glucopiranosa (Kurkov and Loftsson, 2013) donde se pueden alojar moléculas, formándose los denominados complejos de inclusión, mientras que la superficie externa contiene los restos hidroxilo, constituyendo la parte hidrófila (Lindner y Saenger, 1980; Cal y Centkowska, 2008). Esta característica estructural predeterminó la aplicación de las CDs como solubilizantes para compuestos químicos poco solubles en agua permitiendo que las moléculas hidrofóbicas queden atrapadas dentro de la cavidad interna de las CDs mientras que su superficie exterior permite la miscibilidad acuosa (Chen et al., 2015).

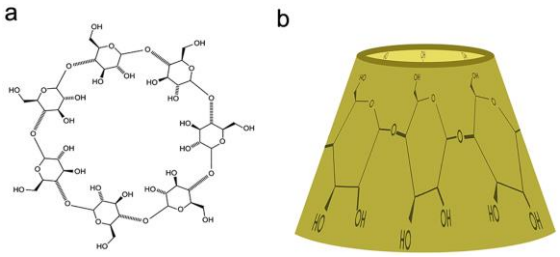


Figura 2. Estructura química (a) y forma toroidal de la ciclodextrina (b) (Varan et al., 2017).

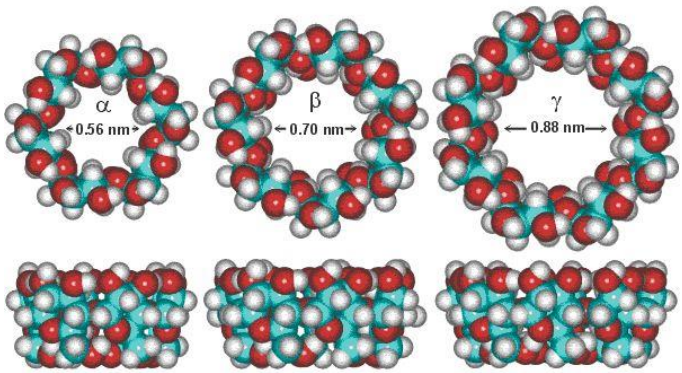


Figura 3. Estructura de las principales CDs naturales

(http://naukas.com/2012/05/21/encapsulando-a-niemann-pick/)

Las diversas CDs (Figura 3) presentan cavidades de distintas dimensiones (γ > β > α), por lo que una buena acomodación de la molécula huésped al tamaño de la cavidad se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, hecho que supondrá un valor más alto de estabilidad (Blanco y cols., 1991). En un medio acuoso, la cavidad toroidal puede almacenar de 6 a

17 moléculas de agua dependiendo del tipo de ciclodextrina, que puede ser reemplazado, con una pequeña cantidad de energía, por moléculas no polares (López-Nicolás et al., 2014). Gracias a esta estructura, son capaces de formar complejos de inclusión, tanto en medio sólido como líquido (Szejtli, 1998; Varca et al., 2010). La capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión con moléculas hidrófobas que quedan atrapadas en el centro acuoso de liposoma (Chen et al., 2014) podría aumentar potencialmente la relación masa de fármaco/lípido a niveles superiores a los alcanzados por una incorporación convencional de principios activos en la fase lipídica de los liposomas. Las CDs se utilizan principalmente como agentes complejantes para aumentar la solubilidad acuosa de fármacos poco solubles en agua, así como para aumentar su biodisponibilidad y estabilidad (Cal y Centkowska, 2008). Además, pueden ser utilizadas para reducir o prevenir la irritación gastrointestinal y ocular, reducir o eliminar olores o sabores desagradables, así como prevenir interacciones fármaco-fármaco o fármaco-excipiente (Lantz et al., 2006; Brewster y Loftsson., 2007). Algunos autores han demostrado recientemente mediante estudios toxicológicos *in vivo* que formulaciones de ciclosporina A incluida en ciclodextrinas, tras su administración oftálmica en conejos, fueron bien toleradas cuando se administraron una o dos veces al día durante tres meses y no causaron inflamación o irritación (Jóhannsdóttir et al., 2017).

Aunque las ciclodextrinas se han estudiado durante más de 100 años y se pueden encontrar hoy día en al menos 35 productos farmacéuticos, todavía se consideran nuevos excipientes farmacéuticos. Según algunos autores, el interés por las CDs, a juzgar por el número de publicaciones y patentes, está creciendo exponencialmente como se ilustra en la Figura 4 (Brewster y Loftsson, 2007). Actualmente, solo han sido comercializados α-CD, β-CD, γ-CD y algunos de sus derivados.

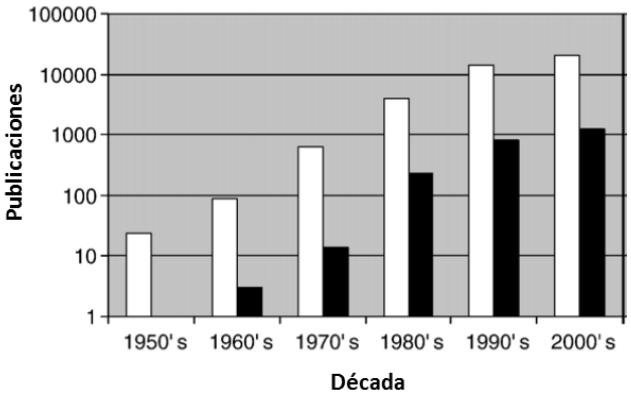


Figura 4. Publicaciones relacionadas con las ciclodextrinas (barras blancas) y aplicación farmacéutica que implica solubilización por ciclodextrinas (barras negras), según lo indicado por SciFinder (ACS, Columbus, OH). Figura adaptada de Brewster y Loftsson, 2007.

Un análisis comparativo de más de 30 CDs contenidas en formulaciones farmacéuticas muestra que la β-ciclodextrina es comúnmente la más empleada. La razón de ello radica en la facilidad de su producción y el consiguiente bajo precio. Sin embargo, la β-CD tiene algunos inconvenientes, principalmente su solubilidad acuosa relativamente baja. En general, esta baja solubilidad relativa de las CDs naturales en agua limita considerablemente las aplicaciones de estos compuestos. Con el fin de mejorar estas deficiencias, se han ido desarrollando diferentes modificaciones de las CDs naturales y para aumentar aún más su solubilidad acuosa, se han realizado algunas modificaciones químicas para obtener derivados de CD con mejor solubilidad en agua. La adición de grupos funcionales a los grupos hidroxilos de las ciclodextrinas constituye el punto de partida para la modificación estructural. Según el radical insertado, existen distintos tipos de derivados, siendo los más utilizados los derivados hidroxipropilados (HP) como la hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), derivados con mejores propiedades de complejación y de solubilidad. Esta CD resulta de una hidroxipropilación inespecífica de la β-CD natural mediante condensaciones con óxido de propileno, como se observa en la Figura 5.

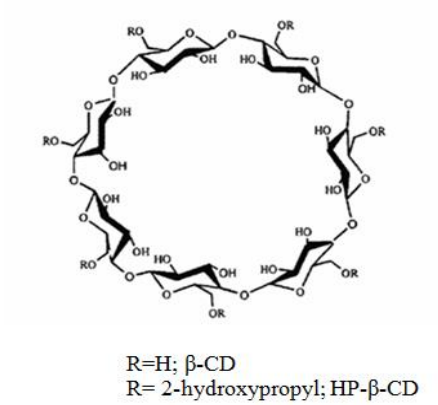


Figura 5. Estructura de la β-ciclodextrina. Si el radical R=H, sería la ciclodextrina natural y, si el radical R=2-hidroxipropil, sería la HP-β-CD.
(https://www.intechopen.com/source/html/20163/media/image2.png).

Se cree que la baja solubilidad de la β-CD es causada por su estructura; sus dimensiones moleculares son óptimas para la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares que contrarrestan la hidratación de β-CD, reduciendo así su solubilidad. Una solución universal a este problema se encontró en la sustitución de múltiples hidroxilos beta en ambos bordes de la molécula (es decir, fijación aleatoria de restos orgánicos) causando la rotura de la construcción del enlace de hidrógeno intramolecular que, junto con la reducción de la cristalinidad, dio como resultado un notable aumento de solubilidad acuosa (Kurkov y Loftsson, 2013).

Aparte de aumentar la hidrosolubilidad de la ciclodextrina natural, debido a la condensación inespecífica, cabe destacar la formación de un compuesto amorfo, con buenas propiedades de hidrosolubilidad, tanto como molécula pura como complejo (Granero et al., 2008b). El objetivo principal de la hidroxipropilación ha sido, por tanto, aumentar la solubilidad acuosa del producto de partida, simultaneando las ventajas de un derivado hidrosoluble y una estructura amorfa (Pitha y Pitha, 1985). La hidroxipropilación no es una reacción selectiva, sino que conduce a una mezcla con diferentes grados de sustitución. La capacidad de coexistir entre los diferentes compuestos hidroxipropilados en la mezcla final explica su incapacidad para cristalizar y, por tanto, la obtención de una sustancia amorfa (Irie et al., 1988). La HPβCD es un derivado que se usa ampliamente para mejorar la solubilidad de fármacos hidrofóbicos con su mejor solubilidad acuosa y mayor seguridad

(Wang et al., 2016). Por tanto, estos compuestos supondrían una buena opción para el estudio del aumento de solubilidad de ACZ, como afirman algunos autores (Kaur et al., 2002; Loftsson et al., 2005; Granero et al., 2008).

Teniendo en cuenta las características de solubilidad del fármaco, se planteó la posibilidad de utilizar este derivado, HP-β-CD, por su capacidad de complejar a la vez que solubilizar ACZ (Kaur et al., 2002; Loftsson et al., 2005; Granero et al., 2008a). Estas CDs, al ser moléculas de elevado peso molecular y muy hidrófilas, no penetran a través de las membranas biológicas. Este hecho hace que sean unas perfectas candidatas como transportadores o "*carriers*" y, a su vez, como potenciadores de la penetración, asegurando una elevada concentración de fármaco disuelto (en forma de reservorio) en la superficie de la membrana (Loftsson et al., 1991a, Loftsson et al., 1991b). Para potenciar aún más el efecto reservorio, estas CDs pueden incluirse en vesículas lipídicas como los liposomas, los cuales, por su naturaleza lipídica, aumentarían el tiempo de permanencia de la formulación en la superficie corneal. De hecho, tanto las CDs de uso parenteral como sus derivados se han utilizado en sistemas dispersos tales como emulsiones, microsferas, nanosferas y liposomas (Maestrelli et al., 2005; Maestrelli et al., 2006; Varan et al., 2017).

Los complejos de inclusión con CDs son complejos moleculares caracterizados por el atrapamiento de una molécula de fármaco lipófilo o, con mayor frecuencia, un resto lipofílico de una molécula de fármaco pobremente soluble en agua, en la cavidad central de la CD. En general, la formación del complejo (S_mCD_n) es un proceso reversible. Los diagramas de solubilidad constituyen el método más utilizado para el estudio de los complejos de inclusión en solución. Mediante éstos, es posible determinar la composición del complejo de inclusión- sustrato, según el siguiente esquema:

$$mS + nCD \overset{K_{m:n}}{\Longleftrightarrow} S_m CD_n$$

siendo *S* el principio activo a acomplejar, *CD* la ciclodextrina, *m* y *n* el número de moléculas de fármaco y CD, respectivamente, para formar un complejo de estequiometría m:n. $K_{m:n}$ es la constante de estabilidad del complejo, también conocida como constante de enlace, constante de formación o constante de asociación.

A su vez, la constante de estabilidad se puede expresar como sigue:

$$K_{m:n} = \frac{[S_m CD_n]}{[S]^m [CD]^n}$$

donde [S] y [CD] denotan las concentraciones molares.

Las fuerzas impulsoras responsables de la formación del complejo incluyen interacciones electrostáticas, contribuciones de Van der Waals, la liberación de tensión conformacional e interacciones de transferencia de carga (Liu y Guo, 2002; Kurkov y Loftsson, 2013).

Este método fue descrito inicialmente por Higuchi y Connors (Higuchi et al., 1965). El ensayo se basa en la determinación de la variación de solubilidad del sustrato en función de la adición del agente complejante. La molécula se adiciona en exceso a soluciones que contienen concentraciones crecientes de ciclodextrinas, bajo condiciones de agitación y temperatura constantes.

El comportamiento del fármaco en este estudio puede ser muy diverso. En la Figura 6 se recoge un esquema con las diferentes posibilidades.

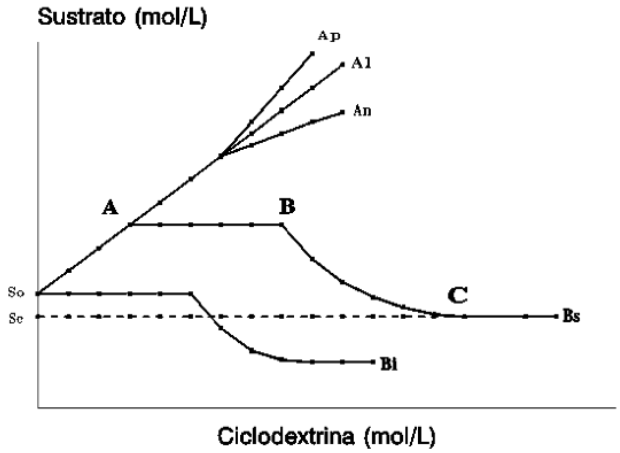


Figura 6. Gráfica con los diferentes diagramas de solubilidad (Moyano et al., 1994).

- **Tipo A**: El diagrama obtenido es una línea recta. Este resultado indica la presencia de un compuesto de inclusión sin límite de solubilidad, al menos a las concentraciones de CD ensayadas. Dentro de este tipo, a su vez, pueden darse diferentes casos:
  · A_L: el complejo de inclusión posee estequiometría 1:1.

  · A_P: el complejo de inclusión posee una estequiometría superior a 1:1.

· A_N: son curvas difíciles de interpretar cuantitativamente, pues las interacciones soluto/solvente o soluto/soluto complican el sistema.

- **Tipo B**: Se obtienen cuando el complejo de inclusión posee el límite de solubilidad, por encima del cual precipita.

Fatouros demostró que el principal requisito que se debe cumplir para que la estrategia de usar liposomas-fármaco-CDs sea beneficiosa, es que el principio activo sea capaz de formar un complejo de inclusión con una molécula de ciclodextrina altamente soluble (Fatouros et al., 2001). Así, son numerosos los autores que han seguido esta línea de investigación con resultados prometedores tal y como se recoge en la Tabla 1.

Un aspecto importante a destacar, que radica en la naturaleza sacarídica de las CDs, es su ausencia de toxicidad en los humanos. Sin embargo, este hecho no fue reconocido de inmediato y pospuso el uso de las CDs durante décadas. Sin embargo, actualmente se utilizan activamente en productos farmacéuticos, incluidas formulaciones destinadas a inyección, que requieren especificaciones estrictas con respecto a la tolerancia en humanos. Varios productos farmacéuticos que contienen CDs han sido aprobados por las agencias reguladoras de EE.UU., la UE y Japón (Szejtli, 2004; Loftsson et al., 2005b; Loftsson y Duchêne, 2007), continuando con su comercialización actualmente en todo el mundo a escala industrial.

En esta parte de la memoria, los esfuerzos se han volcado hacia el estudio del comportamiento de ACZ complejada en HP-β-CD introduciendo dichos complejos en sistemas de administración nanoparticulares, como vesículas lipídicas, y más concretamente, liposomas. El fin que se persigue con estos sistemas es mejorar sus características de permeabilidad, con el objetivo principal de aumentar su penetración corneal y potenciar finalmente su biodisponibilidad (Kaur et al., 2004).

Fármaco	Resultados	Autores
Benzocaína (BZC) Butamben (BTM)	Se produjo una mejora significativa en el inicio y la duración del efecto anestésico en formulaciones elaboradas mediante la técnica del *double-loading* con respecto a las formulaciones con carga única. El efecto de complejación de anestésicos locales con ciclodextrinas puede ser hipotéticamente uno de los factores responsables de la mejora en la permeabilidad y efecto anestésico de una formulación tópica, según los estudios *in vivo* realizados	Maestrelli et al., 2010
Curcumina (CU)	La CU se incorporó en liposomas como fármaco libre y tras la formación de complejos con hidroxipropilciclodextrinas (HP-β-CD o HP-γ-CD). Es posible aumentar 23 veces la cantidad de CU en formulaciones de liposomas cuando se complejaba previamente, lo que se traduce en una mayor solubilidad. Los resultados demuestran que HP-β-CD estabiliza la CU más que HP-γ-CD	Matloob et al., 2014
Latanoprost (LT)	Los experimentos *in vivo* demostraron que la formulación de LT con CDs (propilamino-β-CD) condujo a una menor irritación ocular que la formulación comercial utilizada como referencia. Se demostró que esta formulación mejora con éxito las principales limitaciones de estabilidad, solubilidad y tolerancia del fármaco antiglaucomatoso para su administración tópica ocular	Rodríguez-Aller et al., 2015
Hidroclorotiazida (HT)	La formación del complejo de inclusión fue efectiva en la mejora de las propiedades biofarmacéuticas de HT y en la protección del fármaco frente a la hidrólisis, mejorando la solubilidad y baja permeabilidad y, en consecuencia, la absorción en el tracto gastrointestinal. Se identificó a la β-CD como la que proporcionó los resultados más prometedores en términos de la solubilización del fármaco	Mendes et al., 2016
Diclofenaco (DF)	Se demostró el potencial de las CDs para generar profármacos que dirigen y direccionan DF específicamente hacia el colon tras una administración oral	Vieira et al., 2016
Melatonina (MT)	Las formulaciones de MT con HP-β-CD no sólo pueden mejorar la solubilidad, la estabilidad, la absorción ocular, y la eficacia terapéutica, sino que además pueden reducir la irritación	Ahn et al., 2017
Sulfamerazina (SMR) Indometacina (INM)	Los estudios de liberación *in vitro* mostraron una fuerte influencia de las CDs en la administración de los principios activos contenidos en los liposomas. Los valores de porcentaje de encapsulación más altos se obtuvieron para SMR e INM con liposomas cuando se utilizó HP-β-CD, obteniéndose 43 veces más incorporación de SMR e INM en comparación con la formulación sin complejar	Aloisio et al., 2017
Glibenclamida (GB)	La cantidad de GB liberada y su velocidad de disolución aumentaron considerablemente mediante la inclusión en complejos con las CDs (HP-β-CD y RM-β-CD) resolviendo el inconveniente de la baja biodisponiilidad que muestra este antidiabético a consecuencia de su baja solubilidad	Lucio et al., 2017
Timolol maleato (TM)	Este estudio investiga cómo los polímeros bioadhesivos (quitosano, ácido hialurónico y alginato) y potenciadores de la permeabilidad (etilenglicol-bis (2-aminoetiléter) - ácido N, N, N ', N'-tetraacético (EDTA) y HP-ß-CD influyen en la permeabilidad del TM a través de córneas bovinas *ex vivo*. Los resultados mostraron que solo los potenciadores de la permeabilidad fueron capaces de aumentar la permeabilidad del fármaco, mientras que los polímeros redujeron significativamente la permeabilidad del mismo	Rodríguez et al., 2017
Tamibarotene (Am80)	Los estudios de disolución in vitro mostraron que la complejación de Am80 con HP-β-CD incrementa notablemente la solubilidad y biodisponibilidad de Am80 en comparación con el fármaco solo. Se observó una disolución de aproximadamente el 97% en 3 minutos, en comparación con Am80 solo, del cual se obtuvo aproximadamente el 60% de disolución en 45 min. Los estudios *in vivo* también corroboraron la mejora para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda refractaria	Yang et al., 2017

Tabla 1. Algunas aplicaciones de las ciclodextrinas.

1.2. NIOSOMAS

Los niosomas (NS) son vesículas lipídicas con una estructura en bicapa compuesta principalmente de tensioactivos no iónicos con o sin incorporación de colesterol (CH) o sus derivados. La producción de NS se inició por primera vez en la industria cosmética, para continuar investigándose posteriormente posibles aplicaciones en la administración de fármacos (Pardakhty y Moazeni, 2013; Marianecci et al., 2014). Desde entonces, se ha mostrado un interés cada vez mayor en la aplicación de estos nanosistemas en el campo de la farmacia, cosmética e industria alimentaria, lo que ha llevado a la publicación de más de 1200 artículos de investigación desde 1980, como una herramienta para mejorar la administración de muchas moléculas: quimioterápicos, péptidos, antígenos y otros agentes bioactivos (Rajera et al., 2011; Marianecci et al., 2014).

El interés por las formulaciones niosómicas se ha ampliado recientemente ya que representan una interesante alternativa en la cual los fosfolípidos han sido sustituidos por tensioactivos no iónicos. Son similares, en términos de estructura y propiedades físicas, a los liposomas, siendo capaces de encapsular tanto sustancias hidrófilas en el compartimento acuoso como lipófilas en las bicapas. Poseen la capacidad propia de los liposomas de ser altamente compatibles con los sistemas biológicos y poseer baja toxicidad debido a su naturaleza biodegradable y no inmunogénica. Mejoran el rendimiento terapéutico de las moléculas protegiendo el principio activo del entorno biológico aumentando su biodisponibilidad. Pero, además, son osmóticamente activos y químicamente estables, lo cual les permite disponer de un elevado tiempo de almacenamiento, en comparación con los liposomas. Su modificación estructural es muy fácil debido a los grupos funcionales presentes sus partes hidrofílicas, y a diferencia de los fosfolípidos, son capaces de superar algunas desventajas asociadas con los liposomas, ya que el manejo de los tensioactivos no requiere especial precaución y condiciones de uso, además de tener mucho menor coste (Carafa et al., 2002; Guinedi et al., 2005; Moghassemi y Hadjizadeh, 2014). Por otra parte, previenen el posible metabolismo del fármaco mediado por enzimas presentes en la lágrima (Solanki et al., 2007).

Como ocurre con los liposomas, las características de los niosomas se ven afectadas por aspectos de formulación, siendo los parámetros más interesantes a regular, el tamaño, la eficacia de encapsulación y el potencial

zeta, los cuales pueden controlarse por el método de elaboración, tipo de tensioactivo y cantidad de colesterol. Así, como afirman Mehta y Jindal (2013), el comportamiento farmacocinético del principio activo encapsulado en este tipo de vesículas viene condicionado por el tamaño y su estabilidad en los fluidos biológicos.

En lo que respecta a nuestra molécula, ACZ, autores como El-Menshawe (2012) han demostrado que la ACZ encapsulada en niosomas produce una reducción significativa de la PIO alcanzando, una hora después de la aplicación oftálmica, un valor sostenido de -15,35 mm Hg , y de -3,65 mm Hg transcurridas 6 horas, en comparación con -10,5 mm Hg tras 4 horas y -2,7 mm Hg a las 6 horas de la aplicación de la solución de fármaco libre. Otros autores han publicado estudios con moléculas antituberculosas como rifampicina, concluyendo que los NS actúan como un buen sistema de depósito para la liberación continua del fármaco, mejorando así su biodisponibilidad y pudiéndose por tanto reducir la frecuencia de administración (Mehta y Jindal, 2013). Estudios *in vivo* han mostrado que ACZ encapsulada en NS de Span® 60 y colesterol ejercieron su efecto de manera más efectiva, prolongando la disminución en la PIO en comparación a la solución del fármaco (Guinedi et al., 2005). Estudios *in vivo* recientemente publicados recogen resultados muy interesantes sobre la aplicabilidad de los NS tras su administración en retina de rata, mostrando una prometedora capacidad de transfectar segmentos externos a la retina y ofreciendo esperanzadoras posibilidades para el tratamiento de muchas enfermedades retinianas (Mashal et al., 2017). La incorporación de ACZ en NS ha solventado también los problemas de coeficiente de partición desfavorable, baja estabilidad y solubilidad y bajo coeficiente de permeabilidad del fármaco; éste último parámetro ha demostrado un efecto significativamente mejor cuando los NS fueron recubiertos con un bioadhesivo (Aggarwal et al., 2004; Aggarwal et al., 2007).

Los tensioactivos son moléculas anfifílicas con un extremo hidrófilo (sulfonatos, carboxilatos, fosfonatos y derivados de amonio, clave en funcionalidades de solvatación) y otro hidrófobo, formado por cadenas de alcanos, fluorocarbonos, grupos aromáticos u otros grupos no polares. Como es bien sabido, los tensioactivos se pueden clasificar en iónicos (aniónicos y catiónicos), con carga negativa y positiva, respectivamente; y anfóteros, que

contienen una cabeza con dos grupos cargados opuestamente) y no iónicos (Steed et al., 2007).

Los tensioactivos no iónicos, a diferencia de los iónicos, no tienen grupos de carga en su cabeza y constituyen una de las mejores alternativas que pueden incluirse en la formulación de sistemas nanotransportadores lipídicos, debido a los beneficios que aportan, relacionados principalmente con la menor toxicidad e irritabilidad comparada con los iónicos. Además, son generalmente menos hemolíticos y tienden a mantener los valores de pH cercano al fisiológico. Pueden desempeñar distintas funciones, actuando como solubilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, potenciadores de la permeabilidad o inhibidores de la glicoproteína P, propiedad extremadamente útil para mejorar la absorción de fármacos y dirigirse hacia tejidos específicos con anticancerosos conocidos, como doxorubicina o daunorubicina, esteroides como hidrocortisona o dexametasona, inhibidores de la proteasa VIH, como rivaconazol o saquinavir, fármacos cardiovasculares como digoxina o quinidina, y betabloqueantes, como acebutolol o timolol, como muestran algunos autores (Kumar y Gannu, 2011).

Hasta el momento, se ha utilizado un gran número de tensioactivos no iónicos con diversos valores HLB como alquiléteres de poliglicerol, glucosil dialquil éteres, éteres de polioxietileno y ésteres tales como series de Brij®, Span® y Tween® (Biswal et al., 2008; Shilpa et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que el HLB es un parámetro adimensional que juega un papel importante en el control de la eficacia de encapsulación del principio activo (Kumar y Gannu, 2011). Los tensioactivos con valores de HLB entre 3 y 8 se utilizan a menudo para formar parte de superficies en bicapa (Moghassemi y Hadjizadeh, 2014).

Asimismo, otro parámetro importante que tiene un efecto directo sobre el porcentaje de encapsulación del fármaco es la temperatura de transición de fase (TC) del tensioactivo. De todos ellos, Span®60 (ejemplo de surfactante con alta TC) exhibe la mayor eficacia de encapsulación (Kumar y Gannu, 2011; Biswal et al., 2008). Los tensioactivos de la serie Span® se proponen como material para la elaboración niosomas debido a sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas, que permiten modular la estabilidad y las características de los sistemas niosomales debido a su influencia en la fluidez de las bicapas (Jain y Vyas, 1995; Paolino et al., 2006). Span®60 es un éster de sorbitano y ácido esteáricoque, a menudo, se utiliza en combinación con

uno o más tensioactivos para lograr un valor de HLB deseado. Además, el colesterol se adiciona a formulaciones niosomales para bajar la temperatura de transición de fase del cristal líquido, así como el valor HLB general de la mezcla de surfactante utilizada en la preparación, lo que permite la adecuada formación de los NS. También se ha visto que la presencia de CH ante tensioactivos más hidrófobos favorece la formación de las vesículas, suprimiendo la tendencia del surfactante para formar agregados (Uchegbu y Vyas, 1998; Moghassemi y Hadjizadeh, 2014). Generalmente, un material duro como Span®60 debe mezclarse con al menos uno de los materiales blandos, por ejemplo, Brij®52, Brij®72 o Brij®80 para lograr la consistencia deseada. El Brij®72 es un derivado estearílico del éter polioxietileno con buenas propiedades formadoras de vesículas (González-Rodríguez et al., 2012). En particular, Brij®72 forma múltiples vesículas laminares con alta eficacia de encapsulación. Autores como Tabbakhian et al., (2005) demostraron que vesículas elaboradas con Brij®72 encapsularon más finasterida que aquellos formulados usando otro tipo de Brij®. Esto es probablemente debido a su bajo valor de HLB de 4.9 comparado por ejemplo con el de Brij®76, de 12,4. Ambos, Span® y Brij®, constituyen una gama de tensioactivos biológicamente seguros adecuados para usar en el organismo en administración oftálmica.

Como ya se comentó en el capítulo anterior, TM y ACZ se han incorporado por separado en diferentes sistemas de administración, tales como dendrímeros, nanopartículas poliméricas, micelas y liposomas, pero hasta ahora no hay publicaciones que refieran el encapsulamiento de ambos fármacos en liposomas o derivados de éstos. Cabe destacar que la administración de "TM y ACZ en el mismo tiempo y en el mismo lugar" podría ser una estrategia eficaz para la sinergia *in vivo*, tal y como han llevado a cabo algunos autores para diferentes tratamientos relacionados con otras patologías (Eloy et al., 2016; Li et al., 2016; Song et al., 2017).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es investigar el potencial de las ciclodextrinas y los niosomas como promotores de la penetración con el fin de mejorar la biodisponibilidad y controlar la liberación de ACZ y TM con el desarrollo de una formulación oftálmica. Para ello, se realizarán estudios *in vitro* e *in vivo* para investigar la diferencia entre liposomas elaborados con el

complejo fármaco-ciclodextrina y sistemas vesiculares que no incluyen fosfatidilcolina como los niosomas. Previamente, se fijaron unos objetivos que planteaban analizar y evaluar determinados factores de formulación que pudieran afectar a las características fisicoquímicas, encapsulación y estabilidad de sistemas.

3. MÉTODOS

3.1. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN

3.1.1. Estudios de solubilidad en liposomas con ciclodextrinas

Es de vital importancia conocer el comportamiento de la HPβCD en presencia del resto de los constituyentes de la formulación. Estudios previos del grupo de investigación mostraron una inestabilidad en las formulaciones obteniendo resultados no repetitivos cuando se incorporaba el agente complejante. Es por ello que se considera imprescindible realizar unos estudios preliminares para determinar la existencia de una posible interacción entre los componentes de la formulación. Tras múltiples ensayos, se sospechó una posible interacción entre el colesterol y la HPβCD, refrendado también por la bibliografía. En base a esta información, se planificó un ensayo en el que se programaron tres diagramas de solubilidad de fase diferentes que se diseñaron de acuerdo con la metodología propuesta por Higuchi y Connors (1965), con el fin de confirmar la constante de estabilidad aparente ($K_{1:1}$) y determinar la eficacia de complejación. Los fines perseguidos con estos estudios fueron:

1) **El primero tenía como Determinar la influencia que ejercían concentraciones crecientes de HPβCD en la solubilidad de la ACZ.** Para ello, se adicionó una concentración variable de HPβCD (0,01 – 0,1 M) y un exceso de fármaco correspondiente a unos 30 mg del mismo en viales que contenían 5 mL de Hepes a temperatura ambiente. Con el fin de evitar toda posible interacción en estado sólido de los componentes, la adición del principio activo se realizó tras la solubilización total del vehículo. Los viales se mantuvieron cerrados y en agitación (*ACS 360 TS-K 412*) durante 7 días hasta alcanzar el equilibrio total del sistema. A continuación, se procedió a su posterior cuantificación del principio activo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) previa filtración de

las muestras, con objeto de eliminar la fase sólida presente. Esta se realizó con jeringa y empleando filtros de nitrocelulosa (*Millipore®*) de 0,45 µm de diámetro de poro. Igualmente, se realizaron diluciones adecuadas de las soluciones obtenidas (1:10), con el fin de conseguir la concentración apropiada del fármaco para proceder a su valoración. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2) **Determinar la interacción entre la HPβCD y el colesterol presente en los liposomas, como consecuencia de un desplazamiento de la ACZ complejada.** Para ello, se sigue el método descrito en el punto anterior y se adiciona una cantidad constante de colesterol (20 mg), obteniendo un sistema ternario.

3) **Determinar la interacción entre la HPβCD y el derivado hemisuccinato de colesterol.** Este estudio se llevó a cabo una vez obtenidos los resultados del segundo diagrama, y, habiéndose observado que efectivamente existía interacción entre la ciclodextrina y el colesterol, con el fin de determinar que no ocurrieran interacciones y secuestro por parte de éste sobre la HPβCD.

Los datos de solubilidad de ACZ se representaron gráficamente frente a la concentración molar de HPβCD mediante regresión lineal. Asumiendo la relación estequiométrica 1:1, se calculará la $K_{1:1}$ mediante la relación entre la concentración molar de ACZ en la solución frente a la concentración molar de HPβCD, según la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{Pendiente}{S_0(1 - Pendiente)}$$

donde S_0 es la solubilidad de ACZ en ausencia de HPβCD.

Igualmente, se calculará la eficiencia de complejación (EC) de la ACZ a partir de los datos de la curva de solubilidad de fases, mediante la expresión (Loftsson et al., 2005):

$$EC = \frac{Pendiente}{1 - Pendiente}$$

3.1.2. Niosomas

Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, partiendo de los constituyentes básicos que incluirá la formulación, se puso de manifiesto la influencia de cada componente en el porcentaje de encapsulación, parámetro clave para una adecuada eficacia terapéutica, realizando unos estudios basados en el

clásico ensayo-error previamente a la aplicación del diseño experimental, para determinar los componentes de partida.

Se utilizaron Span®60 y Brij®72 como tensioactivos no iónicos y se estableció la proporción de ambos, así como la cantidad de tensioactivo incorporada en relación al resto de componentes de la formulación. Se realizaron estudios con dos portadores de carga: EA y DCP; y la cantidad añadida de los mismos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Posteriormente, se aplicará el diseño experimental para determinar qué factores tendrán influencia estadísticamente significativa, llevándose a cabo la optimización de la formulación (datos no mostrados) para su posterior análisis *in vitro* e *in vivo*.

3.2. ELABORACIÓN DE VESÍCULAS LIPÍDICAS

3.2.1. TLE (*Thin Layer Evaporation*)

Siguiendo el método TLE, los lípidos se disolvieron en solventes orgánicos y se procedió a la formación de la película lipídica. PC y CHEMS se disolvieron en 4 mL de cloroformo en un matraz de fondo redondo. Asimismo, el agente de carga correspondiente a cada lote (EA o DDAB) y 5 mg de ACZ (sólo lotes elaborados por técnica *double-loading)* se disolvieron en 4 mL de metanol. Tras la evaporación de los disolventes orgánicos por rotaevaporación (Büchi Rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491) a 58 °C, temperatura superior a la de la transición de fases de la mezcla de los lípidos constituyentes, la fina película lipídica se deja en reposo durante 24 h para eliminar posibles residuos del disolvente. En esta etapa del proceso es importante que la eliminación del disolvente se haga de forma homogénea para evitar cristalizaciones y formación de burbujas.

Finalmente, se hidrató con 3 mL de la solución preparada del complejo de inclusión en Hepes, y se sometió la muestra a cinco ciclos consistentes en un minuto de agitación en vortex seguido de cinco minutos en baño termostatizado a 58 °C. Tras este tratamiento, se obtuvieron las muestras con un aspecto lechoso opalescente y homogéneo, conservándose los lotes a 4 °C hasta su caracterización.

Con el fin de incrementar la capacidad de encapsulación del fármaco en el caso de liposomas mediante aumento del espacio acuoso de las vesículas

disminuyendo la laminaridad obtenida por el método TLE, se procedió a la formación de vesículas unilaminares (LUVs) por dos técnicas: extrusión y *Freeze-Thawing* (FAT).

3.2.1.1. Extrusión

Las vesículas obtenidas por TLE se sometieron, cuando fue necesario, a un proceso de extrusión secuencial con el fin de obtener vesículas de menor tamaño, unilaminares y con una distribución de la población más homogénea. El proceso se llevó a cabo utilizando un extrusor (LIPEX™ Thermobarrel Extruder) con nitrógeno para aplicar una presión moderada (100 a 800 psi), forzando así el paso de las vesículas a través de los filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. Las muestras se extruyeron a una presión de 600 psi por triplicado a través de filtros de policarbonato de 0,8 µm, haciéndose pasar cada uno de los lotes cinco veces por el extrusor. A éste se le adaptó un sistema de recirculación de agua termostatizada mediante una bomba peristáltica, lo cual permitió extruir en el rango de temperaturas de transición de fases (gel-líquido cristalino) de 60 °C.

3.2.1.2. Método Freeze-Thawing (FAT)

Esta técnica consiste en someter una dispersión de liposomas MLVs preformada a 10 ciclos de congelación durante 30 segundos (en nitrógeno líquido) y descongelación en un baño a una temperatura de 58 °C durante 30 segundos. Durante la etapa de congelación, la bicapa lipídica seca o deshidratada entra en contacto con el fármaco a encapsular, potenciándose la eficacia de encapsulación debido a la rotura que se produce de los MLVs y la posterior formación de poblaciones vesiculares más homogéneas, que se asemejan más a LUVs (Castile, 1999; Traïkia y Warschawski, 2000). Posteriormente, al descongelar la muestra, las posibilidades para atrapar las moléculas son mucho mayores.

La elaboración de liposomas se llevó a cabo según las técnicas anteriormente descritas. La composición de éstos queda recogida en la Tabla 2.

Componente	Fase lipídica	Fase acuosa
PC	0,0954 mmol	-
CHEMS	0,0812 mmol	-
Cloroformo	3,8 mL	-
Metanol	3,2 mL	-
HP-β-CD	-	0,3 mmol
Inductor carga positiva: EA ó DDAB	4 u 8 mmol	-
Hepes pH 7.4	-	3 mL
TM	1,5 mg	
ACZ	0 mg o 5 mg*	15 mg

Tabla 2. Tabla con la composición de la formulación de liposomas. PC: fosfatidilcolina. CHEMS: Colesterol hemisuccinato. EA: Estearilamina. DDAB: bromuro de dodecil dimetil amonio. ACZ: acetazolamida. HP-β-CD: Hidroxipropil-β-ciclodextrina. (*) En lotes donde se emplee la técnica del *double-loading* se añadirán adicionalmente 5 mg de ACZ disueltos en la fase lipídica.

En este estudio, la capacidad de solubilización y complejación de la HP-β-CD permitió elaborar una solución 5 mg/mL de ACZ con 0,1 M de HP-β-CD en tampón HEPES a pH 7,4. Dicho tampón mantiene a la formulación a pH cercano al de las lágrimas.

La técnica de elaboración utilizada para los niosomas fue TLE. La composición de éstos queda recogida en la Tabla 3.

Componente	Fase lipídica	Fase acuosa
Span®®60	25-50 mg	-
Brij®®72	25-50 mg	-
Cloroformo	3,8 mL	-
Metanol	3,2 mL	-
CH	42,85 mg	
TM	1,5 mg	
Inductor carga positiva: EA o DCP	2,5-5 mg	-
Hepes pH 7.4	-	3 mL
ACZ		1,5 mg

Tabla 3. Tabla con la composición de la formulación de niosomas.

EA: Estearilamina. TM: Timolol maleato. ACZ: acetazolamida. CH: colesterol.

3.3. LIPOSOMAS CON CICLODEXTRINAS: ETAPA DE SCREENING

La elaboración de los liposomas que incluían CDs se llevó a cabo mediante la realización de un *screening* o cribado, en el cual se pretende discriminar, de entre un número determinado de variables y niveles, los que realmente

ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas en evaluación. Para evaluar los resultados obtenidos, se fijaron como variables de respuesta la eficacia de encapsulación, el tamaño vesicular, el índice de polidispersión y el potencial zeta, con el fin de conocer la influencia de los diferentes factores incluidos en estos parámetros. Con ello se intenta poner de manifiesto la influencia que ejercen los diferentes parámetros (método de elaboración, cantidad y tipo de agente de carga, y uso de la técnica del *double-loading*), sobre las variables respuestas. En concreto, se estudió el efecto que tiene el cambio en los niveles de cada variable sobre cada respuesta considerada. El diseño contiene cuatro variables relacionadas con el proceso de elaboración, asignando a su vez dos niveles para cada una de ellas, como se recoge en la Tabla 4.

FACTOR	**NIVELES**	
	-1	**+1**
Método de elaboración	Extrusión	FAT
Agente de carga	EA	DDAB
Cantidad agente	4 mmol	8 mmol
Double-loading	No	Si

Tabla 4. Niveles y factores del estudio. FAT: *freeze-thawed vesicles*. EA: estearilamina. DDAB: dodecil dimetil amonio.

La elección del método experimental se basa en que el modelo matemático que se elija debe indicar la relación existente entre la variable respuesta y las principales fuentes de variación identificadas como factores. Es fundamental, por tanto, que el modelo elegido se ajuste a la realidad con la mayor precisión posible. Entre los distintos diseños que minimizan la varianza de estos coeficientes de regresión se encuentran los diseños ortogonales de primer orden. Según la distribución de factores descrita anteriormente, se eligió el modelo experimental adecuado al objetivo del experimento y al número de factores en estudio. Para ello, de entre todos los posibles, se seleccionó un tipo de estudio basado en el modelo de Taguchi. Estos métodos, ya vistos en estudios anteriores, emplean diseños factoriales fraccionales a dos o más niveles y utilizan matrices ortogonales. La matriz resultante con la composición de las formulaciones de liposomas se resume

en la Tabla 5. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, y se elaboraron lotes control en blanco con el fin de asegurar que los resultados no estaban influenciados por el fármaco.

LOTE	Tratamiento a MLVs	Tipo de agente de carga	Cantidad de agente de carga (mmol)	*Double-loading*
1	Extrusión	EA	4	Sí
2	Extrusión	EA	8	No
3	Extrusión	DDAB	4	No
4	Extrusión	DDAB	8	Sí
5	FAT	EA	4	No
6	FAT	EA	8	Sí
7	FAT	DDAB	4	Sí
8	FAT	DDAB	8	No

Tabla 5. Composición de los lotes de liposomas elaborados según matriz experimental de Taguchi L_8.

Los resultados obtenidos, al igual que en el capítulo I, se analizaron e interpretaron mediante ANOM y ANOVA, con el fin de comparar las medias de los tratamientos con la media global de las respuestas obtenidas, y así poder discriminar entre aquellas que son significativas y aquellas que no lo son, con el objeto de emplear dicha información en la optimización de nuestro sistema.

El diseño experimental aplicado a la formulación de los niosomas no se incluye en este capítulo.

3.4. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SISTEMAS VESICULARES

3.4.1. PdE

La cuantificación de ACZ y TM encapsulados en liposomas y niosomas se determinó tras su extracción por centrifugación. La muestra se preparó transfiriendo 0,7 mL de la dispersión coloidal previamente homogeneizada a un eppendorf, centrifugando la muestra para separar ambas fases (60 min, 8000 rpm, 4 °C) (González-Rodríguez et al., 2016). Posteriormente, se separó

el sobrenadante de la fracción sedimentada y se diluyó hasta 2 mL con Hepes para cuantificarse adicionalmente. A partir de esta alícuota, se determinó la fracción de fármaco no encapsulada. Por otra parte, el sedimento se diluyó a 3 mL con laurilsulfato de sodio al 0,5% p/v para asegurar la ruptura de las vesículas y la salida de los fármacos encapsulados. Dicho proceso se desarrolló sometiendo las muestras a varios ciclos de vórtex-sonicación. Finalmente, las soluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de membrana (0,45 µm) para su cuantificación posterior mediante el método por HPLC descrito en el capítulo II. Las muestras se analizaron por triplicado y el PdE se calculó usando la siguiente ecuación:

$$PdE = \frac{\left(\left(\frac{A_m}{A_{std}}\right) * C_{std} * 10{,}6\right)}{(X)} x100$$

donde A_m: área del pico de la muestra; A_{std}: área de pico de la solución estándar; C_{std}: concentración (mg/mL) de solución patrón (ACZ o TM); X: cantidad (mg) de fármaco añadido.

3.4.2. <u>Análisis dimensional y carga superficial</u>

El tamaño y el IPde las vesículas se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz utilizando el equipo Zetasizer Nano-S a temperatura ambiente (Malvern Instruments, Malvern, UK). El valor de IP inferior a 0,2 indica una población homogénea y monodispersa mientras que un IP mayor (> 0,3) indica heterogeneidad.

El potencial zeta (PZ) se determinó a partir de mediciones de movilidad electroforética (µ). La movilidad µ se convirtió a PZ por la ecuación de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon$$

donde η es la viscosidad y ε es la permitividad de la solución.

Las formulaciones se diluyeron 1:20 en agua MilliQ®. Las muestras se midieron a una temperatura de 25 °C, por triplicado y se presentaron como media ± DE.

3.5. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VITRO

Los estudios de liberación *in vitro* constituyen una etapa esencial durante el desarrollo de un medicamento, ya que no solo sirven para el control de calidad de las formulaciones, sino que también pueden reflejar el rendimiento *in vivo* del producto (Claro de Souza et al., 2015). En el presente trabajo, la velocidad de liberación del fármaco a partir de formulaciones dependerá de la composición, la proporción relativa de los componentes en las vesículas y la distribución del tamaño de las vesículas (Cipolla et al., 2014).

Los ensayos de liberación de TM y ACZ tanto de los liposomas de los niosomas se llevaron a cabo por el método de diálisis. En este estudio, se colocó 1 mL de la dispersión coloidal en una bolsa de diálisis (Spectra/Por 4, tamaño de poro 12-14 kD), previamente hidratada durante 1 hora, sellando ambos extremos con un clip de diálisis. El dispositivo se incubó entonces en 50 mL de lágrimas artificiales ($NaHCO_3$ 0,200% p/v, NaCl 0,670% p/v $CaCl_2$ 0,008% p/v), manteniendo la velocidad de agitación a 100 rpm y 37 °C (IKA® RT10), reproduciendo así parcialmente el medio biológico (Bhowmik et al., 2011). A intervalos de tiempo predeterminados, se recogieron alícuotas de medio de disolución y se sustituyeron por el mismo volumen de medio fresco. La cantidad de fármaco disuelta con el tiempo se cuantificó empleando el método de HPLC anteriormente descrito.

Este ensayo se realizó utilizando la formulación de liposomas con CDs y niosomas de ACZ y TM optimizadas a lo largo de este capítulo, procedentes de los resultados obtenidos y soluciones control de ambos fármacos; asimismo, se comparó con formulaciones idénticas que incorporaban los fármacos por separado.

3.6. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VITRO

Los estudios de permeación se han realizado, al igual que en el capítulo II, en celdas de difusión de Franz (área de difusión de 3,14 cm^2) utilizando una membrana de celulosa (Whatman®) previamente impregnada con una solución de gelatina y saturadas con la fase receptora (FR) durante 30 minutos para simular las condiciones de la córnea. Las membranas se montaron entre el compartimento donador y el receptor. Este último se llenó con 14 mL de solución tampón Hepes a pH 7,4 y se mantuvo a 37 °C bajo agitación continua (SES-Gmgh Analyse systemes, Alemania). La

preparación se colocó en el compartimento donador en condiciones no oclusivas y el estudio de permeación continuó durante 24 h. Se recogieron alícuotas de 1 mL a los 15 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 h de acuerdo con las directrices internacionales, reemplazado el mismo volumen con FR mantenida a la misma temperatura. La concentración de activos se determinó por HPLC. Los datos obtenidos se procesaron con el software Microsoft Excel y el software G-STAT 2.0.

Los parámetros de permeabilidad ACZ y TM se calcularon representando la cantidad de fármaco permeado a través de la membrana (mg/cm^2) en función del tiempo (min), usando la parte lineal de las curvas (fase inicial). El flujo de estado estacionario J se determinó con la siguiente relación (Attama et al., 2008):

$$J = \frac{\delta Q}{A \delta t}$$

donde Q indica la cantidad de fármaco impregnado, A es el área de difusión, t es el tiempo de exposición.

El coeficiente de permeabilidad P en cada caso se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$P = \frac{J}{C_0}$$

donde C_0 es la concentración de fármaco en el medio donador (masa/volumen).

Los lotes utilizados para este ensayo fueron los mismos que los empleados en el ensayo de liberación.

3.7. ESTUDIOS DE EFICACIA IN VIVO

Para este ensayo, se han utilizado 10 conejos normotensos neozelandeses, machos blancos no sedados, de 2-2,5 kg de peso cada uno. Los procedimientos de manipulación animal basados en la resolución sobre el uso de animales en la investigación establecida por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO), la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/CEE) y el Comité institucional de atención y utilización de los animales en Investigación, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, fueron revisados y se comprobó el cumplimiento de los protocolos.

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales, teniendo libre acceso a alimentos y agua, y se mantuvieron en un ciclo controlado 12/12 h de luz/oscuridad. Las formulaciones se aplicaron en los 10 conejos (n = 20 ojos) y cada control se evaluó en 5 de ellos (n = 10 ojos). La PIO se midió con un tonómetro de rebote Tonovet (Tiolat, Helsinki, Finlandia), técnica tópica que no requirió anestesia. Para cada ojo, la PIO se fijó al 100% con dos lecturas basales tomadas 30 minutos antes e inmediatamente después de la instilación. Luego, una sola dosis de la formulación (50 µL) se aplicó a ambos ojos. Se realizaron determinaciones de la PIO cada hora durante las siguientes 7 h. Como control, los conejos recibieron formulaciones sin el agente hipotensor. El protocolo de administración incluyó al menos, un período de lavado de 48 h entre los experimentos.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba t de Student para comparar las diferencias entre los grupos. Los resultados se expresaron como las medias ± DE y los resultados con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los experimentos se realizaron por triplicado. La reducción fue de tipo intraocular hipotensor, y se expresó como media ± error estándar de las medias (SEM). Las diferencias estadísticas entre dos valores se evaluaron por el test t de Student de dos vías, y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) cuando fue necesario.

4. RESULTADOS

4.1. FORMULACIONES DE LIPOSOMAS CON CDs

4.1.1. Estudios de preformulación

En este apartado se analizó y evaluó el comportamiento de la HP-β-CD en presencia de ACZ y el resto de los componentes de la formulación con el fin de evaluar la posibilidad de la existencia de interacciones que pudiesen afectar a las características fisicoquímicas, porcentaje de encapsulación y estabilidad de los liposomas.

4.1.1.1 Estudios de solubilidad de fase y eficacia de complejación de ACZ en HP-β-CD

El primer ensayo tenía como finalidad establecer la influencia que ejercían concentraciones crecientes de HP-β-CD en la solubilidad de ACZ. Como se recoge en la Figura 7, el diagrama de solubilidad de fase del fármaco en la solución tamponada con HP-β-CD se corresponde con una representación tipo A_L. La dependencia de la concentración de ACZ en función de la concentración de CD se describe mediante una ecuación lineal lo que indica un aumento proporcional de la solubilidad del fármaco debido al aumento de la concentración de CD. Estos resultados están en concordancia con los de otros autores (Stepniak et al., 2017).

$$[ACZ]_{Hepes} = 0{,}1552 \cdot [HP\beta CD] + 0{,}0034 \quad (r^2\text{: } 0.9942)$$

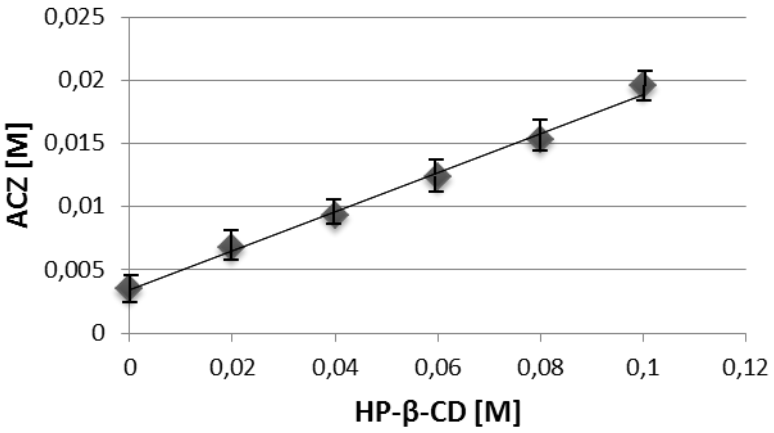


Figura 7. Curva de solubilidad de fase de ACZ en HP-β-CD.

La dependencia lineal de la concentración de ACZ aumentando debido al aumento de la concentración de HP-β-CD sugiere una estequiometría 1:1 del complejo resultante. Por lo tanto, la ecuación propuesta Higuchi y Connors (1965) se utilizó para determinar el valor de la constante de formación del complejo ACZ-HP-β-CD. La constante de estabilidad de ACZ en la solución acuosa de la CD, a 25 °C fue de 41,75 M^{-1}. Como se muestra en la figura, la presencia de HP-β-CD quintuplica la solubilidad de ACZ en una solución acuosa (que es de 0,98 mg/mL a temperatura ambiente).

Además, es necesario evaluar la eficacia de complejación (EC) con el fin de determinar la afinidad de dichas moléculas en el proceso de complejación. El valor obtenido para el sistema ACZ- HP-β-CD (0,18371) se traduce en que una de cada 15,5 moléculas de CD forma complejo con el fármaco (Loftsson et al., 2005; Cavalcanti et al., 2011).

4.1.1.2 Influencia de la presencia de CH en la integridad de los liposomas

Como se refirió en el apartado 3.1.1, estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron una inestabilidad en las formulaciones cuando se incorporaba el agente complejante sospechándose la existencia de una posible interacción entre los componentes. Por ellos, se decidió estudiar la posibilidad de que el CH, constituyente de la formulación de los liposomas, provocase algún tipo de interacción con la CD. Para ello, se decidió realizar los ensayos de solubilidad de ACZ y HP-β-CD en presencia de CH

comparándolos con los resultados obtenidos en ausencia del mismo. Así, en la Figura 8 se puede apreciar el efecto de la presencia del esteroide sobre la solubilidad de ACZ. Existe un desplazamiento del fármaco de la cavidad hidrofóbica de la CD cuando se incorpora CH como componente ternario. Estos resultados están en concordancia con los de otros autores, quienes concluyeron que el CH y la HP-β-CD dan lugar a complejos con una estequiometría de CH·2CD (Tsamaloukas et al., 2005). Como consecuencia de este efecto, la ACZ queda libre en el medio en su forma no solubilizada.

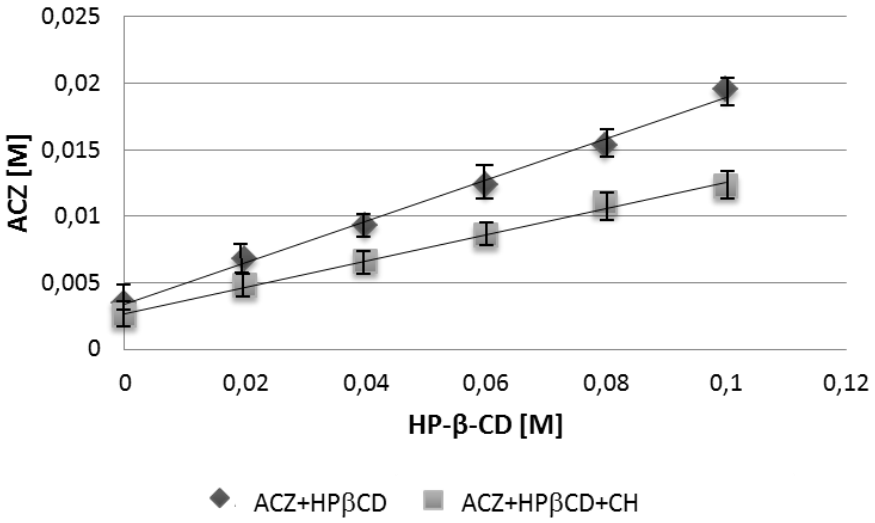


Figura 8. Diagrama de solubilidad del ensayo ACZ-HP-β-CD y ACZ-HP-β-CD + CH.

No obstante, para constatar que este hecho se debía únicamente a la presencia de CH, se propone realizar el ensayo sustituyendo el mismo por un derivado, colesterol hemisuccinato (CHEMS), que presenta una polaridad diferente y del cual no existen evidencias en la literatura de la existencia de interacción con las CDs.El objetivo fundamental de este estudio consistió en Como se observa en la Figura 9, se ratifica que la presencia del CH en la formulación es la causante de la menor solubilidad ya que las formulaciones ensayadas con CHEMS mostraron comportamientos similares a las formulaciones sin CH. Estos resultados están en concordancia con estudios realizados para modificar el contenido de este esteroide de las membranas celulares mediante la incubación de células o membranas modelo con CDs,

que confirman que estos derivados de azúcares pueden usarse para extraer CH de las membranas celulares mediante la formación de complejos de inclusión (Zidovetzki & Levitan, 2007).

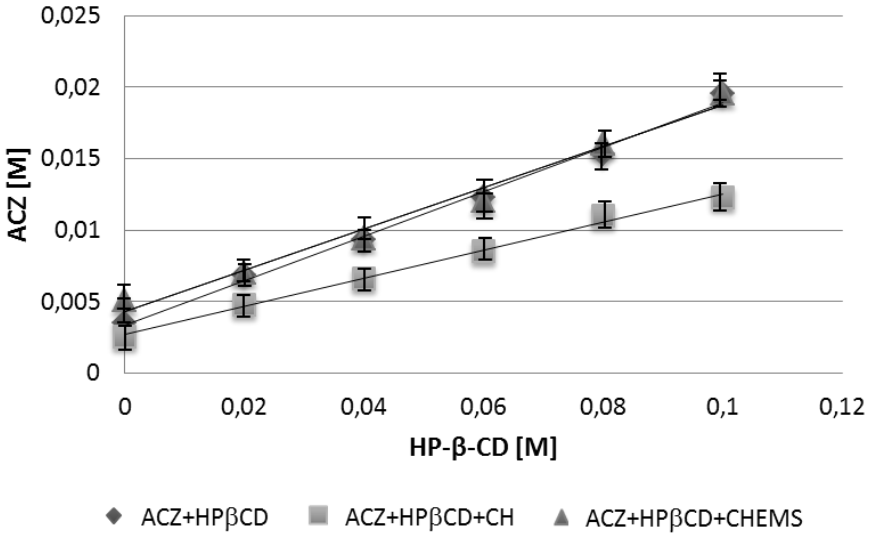


Figura 9. Diagrama de solubilidad del ensayo ACZ-HP y ACZ-HP + CHEMS.

Los resultados que se desprenden del comportamiento de ACZ en presencia de esta CD y en las diferentes condiciones se resumen en la Tabla 6.

Sistema	Pendiente	S_0 (mM)	$K_{1:1}$ (M^{-1})	EC
ACZ-HPβCD	0,1552	4,4	41,75	0,18371
ACZ-HPβCD + CH	0,0988	4,4	24,91	0,10963
ACZ-HPβCD + CHEMS	0,1952	4,4	38,61	0,16986

Tabla 6. Características del proceso de complejación ACZ- HP-β-CD. S_0: solubilidad de ACZ en ausencia de HPβCD . $K_{1:1}$: constante de estabilidad. EC: eficiencia de complejación

Se puede concluir a partir de estos datos que en presencia de CHEMS, el complejo se vuelve más estable, ya que, la cantidad de ACZ complejada por la HP-β-CD es mayor, como consecuencia de la ausencia de interacción HP-β-CD-CHEMS.

4.1.2. Caracterización de las vesículas

Una vez elaborados los liposomas de acuerdo a la matriz obtenida por el método Taguchi en el apartado 3.3, se llevó a cabo la caracterización de las vesículas. Para ello, se realizaron medidas por triplicado de cada uno de los experimentos. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Lote	Potencial Zeta (mV) ± DE	Diámetro medio (nm) ± DE	PDE ± DE (%)
1	-13,5 ± 1,2	762 ± 9 [0,09 ± 0,04]	26,5 ± 2,6
1 B	-12,0 ± 1,1	696 ± 55 [0,20 ± 0,11]	19,3 ± 3,2
2	-4,2 ± 2,3	820 ± 71 [0,18 ± 0,25]	36,1 ± 2,8
2 B	-5,4 ± 3,3	928 ± 105 [1,00 ± 0]	25,9 ± 3,3
3	-15,3 ± 1,9	714 ± 60 [0,28 ± 0,25]	23,1 ± 4,5
3 B	-11,5 ± 0,3	501 ± 28 [0,15 ± 0,05]	18,3 ± 0,9
4	-2,3 ± 1,5	817 ± 51 [0,48 ± 0,25]	45,4 ± 1,2
4 B	-4,0 ± 0,3	614 ± 61 [0,61 ± 0,04]	40,9 ± 4,2
5	-13,6 ± 0,9	1189 ± 72 [1,00 ± 0]	59,4 ± 2,8
5 B	-14,7 ± 0,7	1277 ± 84 [1,00 ± 0]	51,9 ± 2,4
6	-7,6 ± 0,6	1583 ± 170 [1,00 ± 0]	30,2 ± 1,1
6 B	-4,1 ± 0,7	1519 ± 223 [1,00 ± 0]	31,4 ± 2,6
7	-14,8 ± 0,5	1337 ± 197 [0,46 ± 0,44]	31,4 ± 1,5
7 B	-13,7 ± 0,2	1045 ± 92 [0,38 ± 0,44]	28,8 ± 4,4
8	-7,1 ± 3,7	973 ± 83 [0,52 ± 0,47]	19,6 ± 3,5
8 B	-7,9 ± 1,2	789 ± 49 [0,27 ± 0,22]	29,5 ± 1,5

Tabla 7. Resultados de potencial Z, tamaño, IP y PdE de los lotes elaborados.

Una vez obtenidos los datos experimentales, se procedió al análisis de los resultados con el fin de evaluar la influencia de los factores variables del estudio (tratamiento de los MLVs, tipo y cantidad del agente de carga y el método *double-loading*) sobre los parámetros de caracterización los liposomas, para seleccionar la significación de los mismos sobre las respuestas analizadas. Para ello, es importante apoyarse en distintos métodos gráficos y herramientas estadísticas con el fin de determinar si cada factor estudiado influye de una forma significativa en la respuesta evaluada.

Con objeto de determinar si el valor de los efectos producidos fue o no significativo, se fijaron unos límites de decisión denominados límite inferior de control (LDL) y límite superior de control (UDL), a partir de los cuales se define si el efecto es significativo cuando supera el error cometido. Los valores para dichos límites de decisión se encuentran recogidos en cada una de las gráficas de este apartado. En la búsqueda de una composición de liposomas óptima, es necesario definir si lo que interesa es maximizar o minimizar cada una de las respuestas estudiadas. Así, interesa que el potencial Z se encuentre lo más alejado posible de la neutralidad, es decir, que las vesículas se encuentren cargadas, o muy negativa o muy positivamente, para evitar la agregación de partículas como consecuencia de la repulsión electrostática. A su vez también, se persigue que el tamaño de las vesículas sea lo más pequeño posible ya que, de esta manera, se asegura en parte la estabilidad de la población, poblaciones homogéneas (IP bajo) y un porcentaje de encapsulación alto, para así aumentar la eficacia en la administración.

4.1.2.1 Influencia de los factores en el potencial Z

Respecto al potencial Z, según el gráfico ANOM (Figura 10), se puede visualizar que, de los cuatro factores estudiados, ejercieron significación estadística en la respuesta evaluada el método de tratamiento de los MLVs (A) y la concentración del agente de carga (B) ya que los valores obtenidos se encuentran fuera de los límites de error establecidos en el diseño.

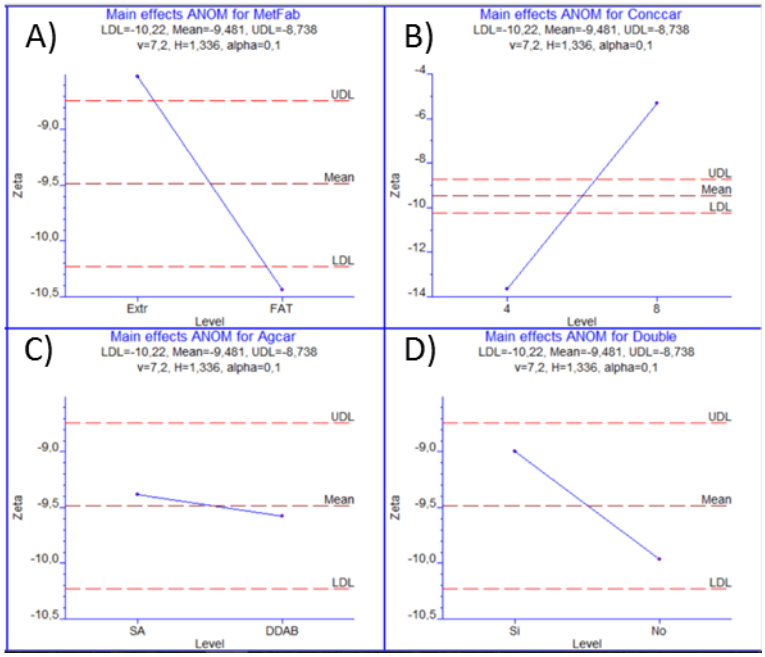


Figura 10. Gráficos ANOM, resultante del DOE, correspondientes a la respuesta del potencial Z con respecto al tratamiento de los MLVs (A), concentración del agente de carga (B), el agente de carga usado (C), y con respecto a *double-loading* (D).

Como se puede observar, el método FAT (A) proporcionó una respuesta más alejada de la neutralidad en cuanto a carga. La cantidad de agente de carga está relacionada de forma proporcional a la respuesta analizada, de forma que los valores del potencial Z se hacen más negativos cuanta menor cantidad de agente de carga se utiliza. Estos resultados obtenidos gráficamente se corroboraron con el estudio ANOVA, que permite deducir qué factores son los que estadísticamente contribuyen e influyen en la respuesta analizada (Tabla 8).

Como se observa en la tabla, donde se representan los factores principales según el grado de contribución en la respuesta analizada, solo el factor B, la concentración del agente de carga, posee alta significación estadística, con un porcentaje de contribución del 87,0%; con respecto al método de tratamiento de las vesículas, que es de un 4,6%.

Factor	F-ratio	I-hat	P-value	Contribución	Significación estadística
A. Extrusión *vs* FAT	6,44	-1,913	0,035	4,6%	Sí
B. 4 mmol *vs* 8 mmol	121,70	+8,312	< 0,001	87,0%	Sí
C. EA *vs* DDAB	0,06	-0,187	0,810	0,0%	No
D. Sí DL *vs* No DL	1,63	-0,962	0,237	1,2%	No

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta ''potencial Z''. FAT: freeze-thaw. EA: estearilamina. DL: *Double-loading*.

4.1.2.2 Influencia de los factores en la distribución de tamaños

En cuanto a la respuesta del tamaño, a continuación, se muestran las gráficas de los efectos principales de cada factor (Figura 11) de las que se desprende que tres de los cuatro factores mostraron significación estadística en la respuesta evaluada, ya que los valores obtenidos se encontraron fuera de los límites de error establecidos.

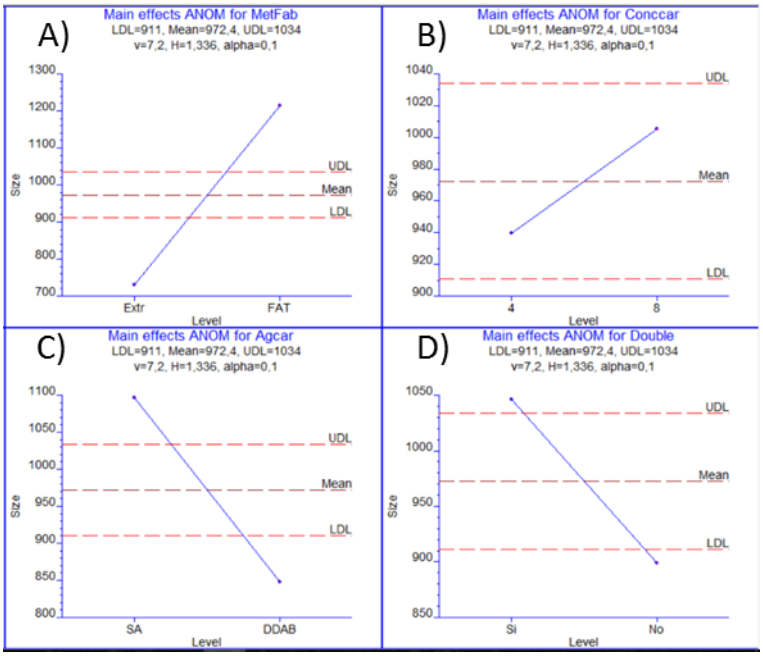


Figura 11. Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del tamaño de vesícula con respecto al método de fabricación (A), concentración del agente de carga (B), el agente de carga usado (C), y con respecto al *double-loading* (D).

En las gráficas se aprecia que el método empleado para obtener LUVs a partir de MLVs (Figura 11 (A)) ejerció un efecto significativo que se aleja

bastante de los posibles errores cometidos, siendo la extrusión la técnica que ofrecía valores inferiores de tamaño respecto a los FAT. Este acontecimiento puede ser atribuido a que, a diferencia del método FAT, en la extrusión la muestra se hace pasar por un diámetro de poro definido, y los liposomas resultantes de este proceso serán del orden del tamaño de poro elegido.

Se pudo observar, a su vez, que el tipo de agente de carga estudiado (Figura 11 (C)) estaba relacionado con un aumento o descenso del tamaño de vesícula; en esta ocasión, con el DDAB se obtuvieron tamaños menores de vesículas que con la EA. Este hecho puede ser atribuido a la flexibilidad que aporta el DDAB a la vesícula, permitiendo así un mayor grado de empaquetamiento (Asasutjarit, 2007), así como a la posible interacción entre la CD y la EA, que puede desestabilizar la bicapa lipídica, dando lugar a mayores tamaños, como postularon Jara et al. (2004).

Como era de esperar, la técnica de *double-loading* (Figura 11 (D)) dio lugar a liposomas de mayor tamaño, mientras que la no utilización de esta técnica originó vesículas de menores dimensiones. Los resultados obtenidos evidencian, por tanto, que la ubicación simultánea de ACZ tanto en la bicapa lipídica como en el espacio acuoso no fue positiva.

En el análisis de la varianza de los factores en cuanto a la respuesta de tamaño (Tabla 9), se obtuvieron datos de significación estadística en los cuatro factores, con un grado de contribución superior para el método de obtención de LUVs, con un 59,3% con respecto a los demás, seguido de un 15,7% del tipo de agente de carga (Factor B).

Factor	F-ratio	I-hat	P-value	Contribución	Significación estadística
A. Extrusión *vs* FAT	64,15	482,6	<0,001	59,3%	Sí
B. 4 mmol *vs* 8 mmol	1,17	65,1	0,311	1,1%	No
C. EA *vs* DDAB	16,99	-248,4	0,003	15,7%	Sí
D. Sí DL *vs* No DL	6,02	-147,9	0,040	5,6%	Sí

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta de tamaño de vesícula. FAT: freeze-thawing. EA: estearilamina. DL: Double-loading.

4.1.2.3 Influencia de los factores sobre el índice de polidispersión

En la representación gráfica para la respuesta IP (Figura 12) se pudo observar que todos los factores excepto el *double-loading* ejercieron significación estadística sobre la respuesta.

Para esta respuesta, las condiciones que favorecerían la obtención de IP bajos serían la extrusión y la utilización de DDAB como agente de carga añadido en cantidad de 4 mmol por formulación. No obstante, el análisis ANOVA arroja resultados poco discriminatorios en cuanto a los factores puesto que los tres factores que ejercieron influencia significativa sobre las respuestas evaluadas presentaron un porcentaje similar de contribución (Tabla 10).

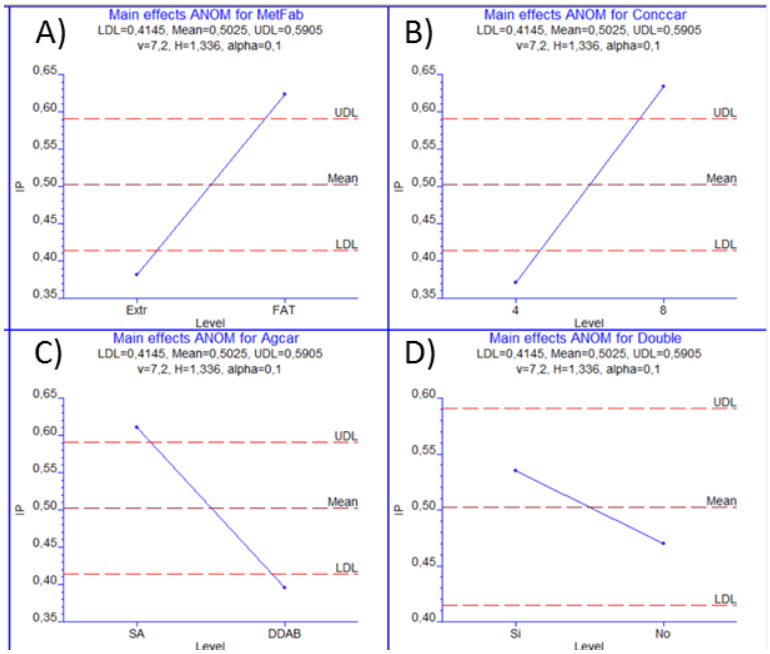


Figura 12. Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del IP con respecto al método de modificación de los MLVs (A), concentración del agente de carga (B), el agente de carga usado (C), y con respecto a *double-loading* (D).

Factor	F-ratio	I-hat	P-value	Contribución	Significación estadística
A. Extrusión *vs* FAT	3,774	+0,242	0,088	14,1	Sí
B. 4 mmol *vs* 8 mmol	4,422	+0,262	0,069	16,5	Sí
C. EA *vs* DDAB	2,967	-0,215	0,123	11,1	Sí
D. Sí DL *vs* No DL	0,271	-0,065	0,617	1,0	No

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta IP. FAT: Freeze-Thawing. EA: Estearilamina. DL: Double-loading.

4.1.2.4 Influencia de los factores sobre el porcentaje de encapsulación

Para determinar si el valor de los efectos es o no significativo para la respuesta de PdE, se fijaron igualmente los límites de decisión, por encima y por debajo de los cuales se considera que el efecto es significativamente

mayor que el error cometido. Los valores, LDL y UDL, se muestran en la Figura 13.

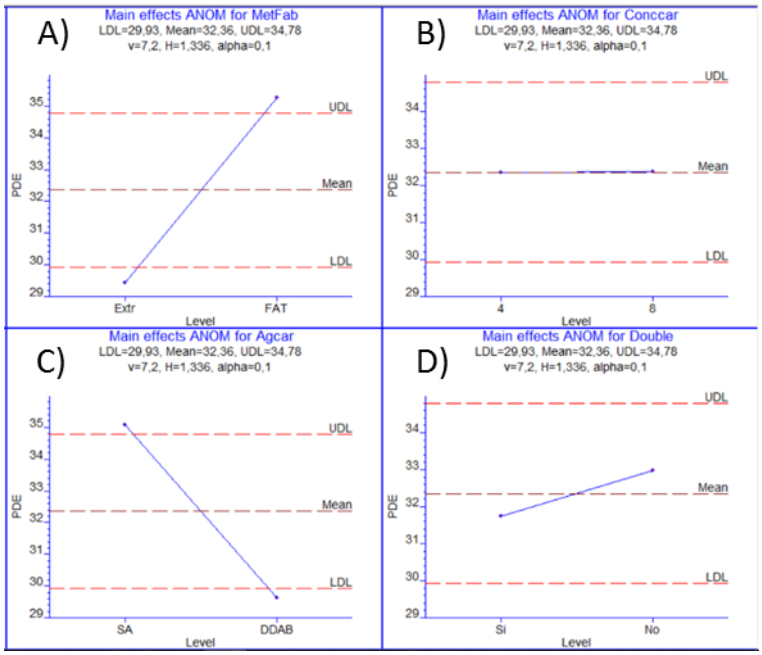


Figura 13. Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del porcentaje de encapsulación con respecto al método modificación de los MLVs (A), concentración del agente de carga (B), el agente de carga usado (C), y con respecto a *double-loading* (D).

Según ANOM, los resultados muestran un efecto significativo en el método de obtención de LUVs y en el tipo de agente de carga, de forma que los liposomas elaborados por FAT favorecen la encapsulación del complejo, así como la aportación de EA en la bicapa.

En estas gráficas se pudo observar que la extrusión dio lugar a formulaciones con un menor PdE que el método FAT, hecho debido probablemente al propio mecanismo de formación de las vesículas unilaminares. Estudios de otros autores confirman la formación de una “multicapa compacta" después de la congelación-descongelación que favorece la capacidad de retención de moléculas (Koide et al., 2016).

No obstante, en el estudio del ANOVA (Tabla 11) se observó que los efectos principales eran escasamente significativos sobre la respuesta evaluada,

siendo las interacciones entre factores las que presentaron un porcentaje de contribución mayor.

Factor	F-ratio	I-hat	P-value	Contribución	Significación estadística
A. Extrusión *vs* FAT	6,031	+5,837	0,040	6,5%	SI
B. 4 mmol *vs* 8 mmol	0,001	-0,037	0,988	0,0%	NO
C. EA *vs* DDAB	5,281	-5,463	0,051	5,7%	SI
D. Sí DL *vs* No DL	0,271	+1,238	0,617	0,3%	NO

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta porcentaje de encapsulación (PdE). FAT: *Freeze-Thawing*. EA: estearilamina. DL: *Double-loading*.

A continuación, a modo de resumen, en la tabla 12 se recogen los niveles apropiados de las variables estudiadas para conseguir las respuestas deseadas.

Factores	PZ	Tamaño	IP	PdE
A. Extrusión vs FAT	FAT	Extrusión	Extrusión	FAT
B. 4 mmol vs 8 mmol	4	-	4	-
C. EA vs DDAB	-	DDAB	DDAB	EA
D. Sí DL vs No DL	-	No	-	-

Tabla 12. Niveles favorables de los factores que ejercieron una influencia estadísticamente significativa para cada respuesta.

Como puede observarse, el método de extrusión y el agente de carga DDAB añadido en menor cantidad proporcionaron a la formulación características más favorables para las respuestas estudiadas. Sin embargo, existe cierta controversia respecto al PdE, el cual se ve maximizado al incorporar EA y utilizar el método FAT, aunque el grado de contribución de FAT y EA respecto a este parámetro de encapsulación es inferior que el que ejercen sobre PZ, Tamaño e IP. Además, el hecho de utilizar FAT y EA en lugar de Extrusión y DDAB supone un aumento de un 6% de eficacia de encapsulación, no resultando relevante si se compara, por ejemplo, con la influencia que ejercen sobre el tamaño, aumentando negativamente en un rango de 300 a 600 nm. Lo mismo ocurre respecto al PZ con el método de obtención de

vesículas más homogéneas, el cual se ve favorecido al utilizar el FAT, siendo esta mejora mínima y teniendo un grado de contribución de tan sólo el 4,6%. Por último, aunque el porcentaje de contribución de la técnica de *double-loading* sobre el tamaño fue muy bajo, dio lugar a liposomas de mayor tamaño. Por ello, no se optó por la ubicación simultánea de ACZ tanto en la bicapa lipídica y en el espacio acuoso, incorporándose ACZ sólo en la fase acuosa.

Así, la composición de la formulación de liposomas optimizada (Lote D) incluye en su formulación el uso de ciclodextrinas en la fase acuosa (Tabla 13). Asimismo, se elaboraron 2 formulaciones control con TM y ACZ por separado (Lote A y B, respectivamente), con una composición igual a la del lote D pero incluyendo un solo fármaco.

Componente	Fase lipídica	Fase acuosa
PC	0,0954 mmol	-
CHEMS	0,0812 mmol	-
Cloroformo	3,8 mL	-
Metanol	3,2 mL	-
HP-β-CD	-	0,3 mmol
Inductor carga: DDAB	4 mmol	-
Hepes pH 7,4	-	3 mL
TM	1,5 mg*	
ACZ	-	15 mg**

Tabla 13. Tabla con la composición de la formulación de liposomas optimizada (Lote D). PC: fosfatidilcolina. CHEMS: Colesterol hemisuccinato. EA: Estearilamina. DDAB: bromuro de dodecil dimetil amonio. ACZ: acetazolamida. HP-β-CD: Hidroxipropil-β-ciclodextrina.*Lote B no incluye TM; **Lote A no incluye ACZ.

Los resultados obtenidos tras la caracterización de la formulación optimizada se recogen en la Tabla 14.

Lote	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)	PdE (%)
Lote D (TM y ACZ)	200,6 ± 1,6	0,13 ± 0,04	29,5 ± 0,3	82,1(TM) 72,6(ACZ)
Lote A (TM)	190,2 ± 4,1	0,13 ± 0,02	27,9 ± 1,0	70,3
Lote B (ACZ)	196,1 ± 2,1	0,16 ± 0,02	32,9 ± 0,2	72,2

Tabla 14. Caracterización de la formulación optimizada (Lote D) que incorpora ACZ y TM. Asimismo, formulaciones con TM y ACZ por separado (Lotes A y B, respectivamente).

4.1.3. Estudios de liberación in vitro

Los estudios de liberación se llevaron a cabo en la formulación de ACZ y TM optimizada (Lote D) y se utilizaron como controles las soluciones estándar de ambos fármacos. Además, se evaluaron formulaciones idénticas que incorporaban dichos fármacos por separado (Lote A: sólo contiene TM; Lote B: sólo contiene ACZ).

La evaluación de la liberación *in vitro* del fármaco desde los liposomas se realizó mediante el método de diálisis. El resultado obtenido por este método proporciona una idea del comportamiento de las formulaciones *in vivo*. La prueba de liberación *in vitro* de formulaciones tópicas predice la duración de la disponibilidad del fármaco en el lugar de acción.

En este estudio, el comportamiento de liberación *in vitro* de TM y ACZ libre y los liposomas cargados con ambos fármacos se resume en la liberación porcentual acumulativa que se muestra en la Figura 14A.

Los perfiles de liberación *in vitro* obtenidos revelaron que la influencia de la composición era evidente. Analizando las primeras 2 h, la cantidad de fármaco liberado fue lineal en la formulación, atribuible a un efecto *burst* del fármaco libre no encapsulado en las vesículas. Los perfiles de liberación de fármaco de los liposomas muestran una pérdida inicial rápida del fármaco seguida de velocidades más lentas de fármaco liberado. Después de este tiempo, fue evidente el comportamiento diferente entre las distintas formulaciones ensayadas. En el caso de TM libre, el 90% del fármaco se liberó dentro de los primeros 60 minutos mientras que el TM encapsulado lo fue liberando durante 5 horas. En el caso de ACZ, este hecho se acentuó,

manteniendo la liberación del 70% durante 11 horas frente a los 60 min que tardó en liberar el 70% la ACZ de la solución control.

Por otra parte, el porcentaje de fármaco que se liberó pasadas 24 horas desde los liposomas y la solución estándar fue similar, demostrando que las vesículas liberan el fármaco contenido a través de la membrana en su totalidad pero de forma más gradual que la solución de TM y ACZ. La composición de la bicapa permite la liberación sostenida de ambos fármacos. Según los perfiles obtenidos, la liberación de TM se produce de forma más rápida que la de ACZ. Este resultado puede estar directamente relacionado con la baja solubilidad de este último fármaco en agua.

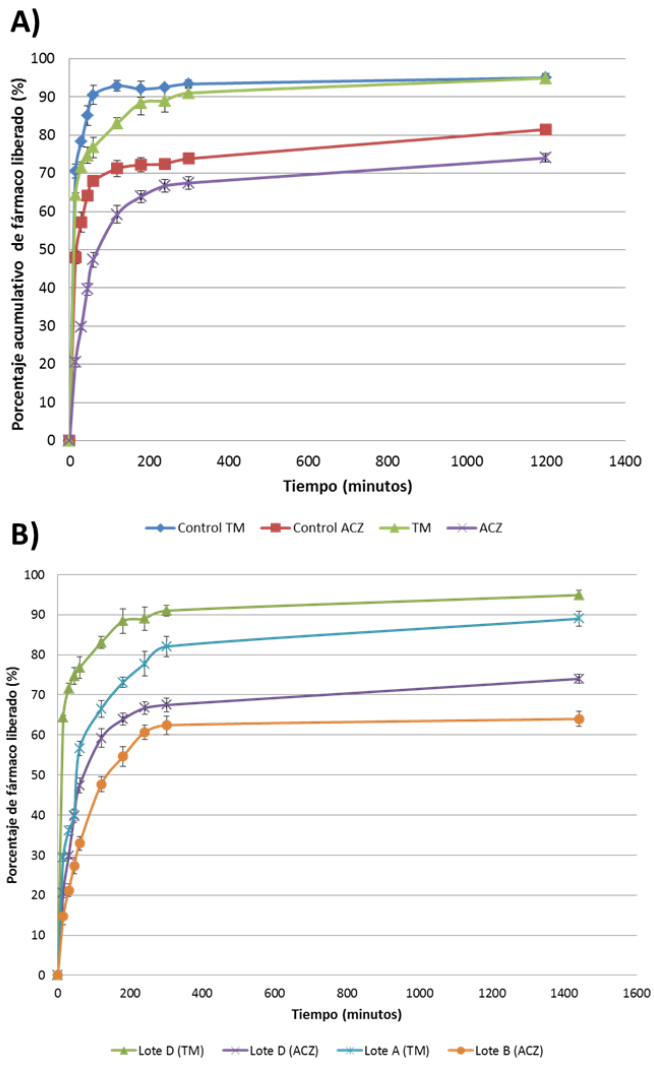


Figura 14. A) Liberación de liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula. B) Liberación de liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula (Lote D) y liposomas que incorporan TM (Lote A) y ACZ (Lote B) por separado.

Tal y como muestra la figura 14B, la velocidad de liberación del fármaco fue más alta desde los liposomas que incorporaban ambos principios activos (Lote D), mientras los liposomas que incluían ambos fármacos por separado controlaron mejor la liberación del mismo. Este hecho, *a priori*, resultaría más interesante para mantener la duración del efecto en el tiempo. Sin embargo, la cantidad final depositada fue notablemente mayor en los liposomas que incluyen ambos fármacos que la de los liposomas con un solo fármaco. Parece que al agregar ambos fármacos a los liposomas se podría

favorecer la cesión al medio de cada uno de ellos. Esto confirma el hecho de que se produzca un efecto sinérgico.

4.1.4. Estudios de permeación in vitro

Se realizaron estudios de permeación *in vitro* para evaluar la influencia de la composición y la disposición de los fármacos de las vesículas en la penetración del fármaco. La formulación de liposomas con ciclodextrina incorporando ambos fármacos se probó en la superficie de la membrana artificial en el compartimiento donador para evaluar su capacidad de penetración a través de la membrana. El porcentaje de TM y ACZ permeado durante 24 h se representó en función del tiempo.

La figura 15A presenta la curva de permeación de TM y ACZ a través de la membrana a partir de la formulación. El porcentaje de TM y ACZ que permeó desde la formulación de vesículas después de 24 h fue significativamente menor al del fármaco permeado de la solución acuosa, mostrando de esta forma, sin embargo, que los liposomas exhibieron una velocidad de penetración inferior a la del fármaco libre, traduciéndose esto en una liberación sostenida del mismo, donde los liposomas actúan como reservorio y acaban cediendo el principio activo en 24 horas. De este modo, el 90% de TM libre permeó en 3 h a diferencia de las 5 h que requirió en penetrar desde la vesícula. Al igual que ocurre en la liberación, este efecto se observó más pronunciado en ACZ, con una permeación del 80% del fármaco en la solución control en 5 h frente a las 20 h que se mantuvo al permear desde las vesículas.

Los resultados también revelaron que, en comparación con la solución, la incorporación de CD en la composición aumentaba notablemente la cantidad de ACZ que puede atravesar la membrana, ya que la formulación es capaz de incluir una concentración de 5 mg/mL de dicho fármaco respecto a los 0,5 mg/mL de la solución acuosa, lo que se traduce en una mejora considerable teniendo en cuenta que actualmente la dosis administrada oralmente ronda los 250 mg. Por tanto, se puede concluir del estudio que la formulación optimizada podría penetrar y depositar más cantidad de ACZ que en ausencia de la HP-β-CD, actuando ésta como promotora de la permeación. El elevado porcentaje de deposición indicó que estas vesículas podrían constituir un reservorio de principio activo para prolongar el efecto del TM, de acuerdo con otros autores (Vieira et al., 2016).

Asimismo, se analizó el efecto que supondría la administración aislada de ambos fármacos por separado en liposomas. Los resultados se recogen en la Figura 15B. Como puede observarse, los liposomas que encapsulan sólo uno de los fármacos presentan también una permeación más sostenida del fármaco, pero al final, al igual que sucedió en la liberación, la formulación que incluyó ambas moléculas permeó una cantidad superior de fármaco a través de la membrana. Además, los perfiles muestran que la permeación de ACZ se ve ralentizada cuando se incluyen ambos fármacos en la vesícula. Esto podría explicarse debido a que la previa salida del TM debido a su elevada solubilidad en medio acuoso podría favorecer la desestructuración de la vesícula, dificultando el paso de la ACZ.

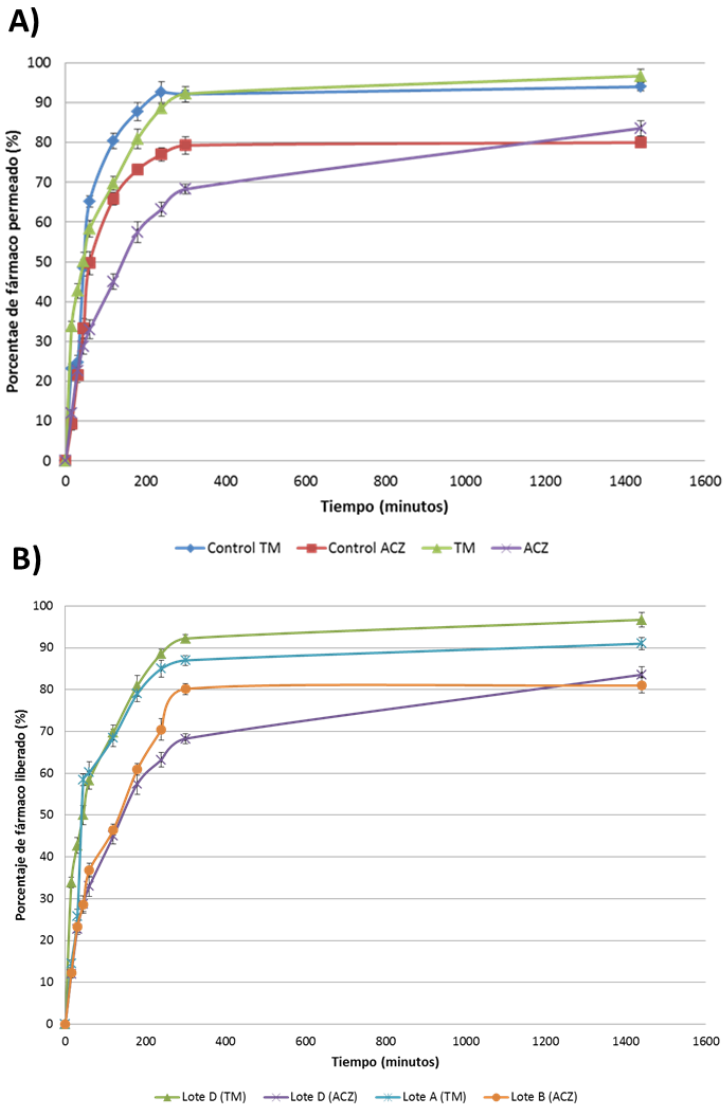


Figura 15. A) Permeación de liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula. B) Perención de liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula (Lote D) y liposomas que incorporan TM (Lote A) y ACZ (Lote B) por separado.

Los resultados también revelaron que, en comparación con solución control, la incorporación del fármaco en las vesículas con ciclodextrinas en la composición podría reducir significativamente el J y P hasta un 50% (Tabla 15). Se puede concluir del estudio que lote D, así como lote A y B, podrían depositar menos TM y ACZ en su fase inicial que la solución control, permeando la misma cantidad de fármaco tras 24 h. No obstante, los lotes que incorporaban los fármacos por separado, presentan una cantidad

inferior de fármaco permeado tras 24 h respecto al lote que incorpora TM y ACZ de forma simultánea.

Formulación	Cantidad permeada en 24 h ($\mu g/cm^2$)	J ($\mu g/cm^2 \cdot min$)	P (mm/h)
Solución control TM	149,68	1,1	0,70
Solución control ACZ	1273,88	9,0	0,57
Lote D (TM)	153,99	0,8	0,51
Lote D (ACZ)	1330,89	5,6	0,36
Lote A (TM)	144,90	0,9	0,57
Lote B (ACZ)	1289,80	5,9	0,38

Tabla 15. Parámetros de permeación ocular. Lote D: liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula; Lote A y B: liposomas que incorporan TM y ACZ, respectivamente, por separado.

4.2. FORMULACIONES DE NIOSOMAS

4.2.1. Estudios previos de formulación

Previa elaboración y optimización de la formulación, se procedió a realizar un estudio para evaluar las condiciones óptimas de partida. Manteniendo constante la cantidad de CH (87,95 mg) y la concentración de principios activos (0,5 mg/mL), se varió la proporción Span®60/Brij®72 (100 mg) para analizar la influencia de esta ratio sobre el PdE, tamaño, PZ y IP. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Figura 16 y Tabla 16. Todas las formulaciones se elaboraron por triplicado.

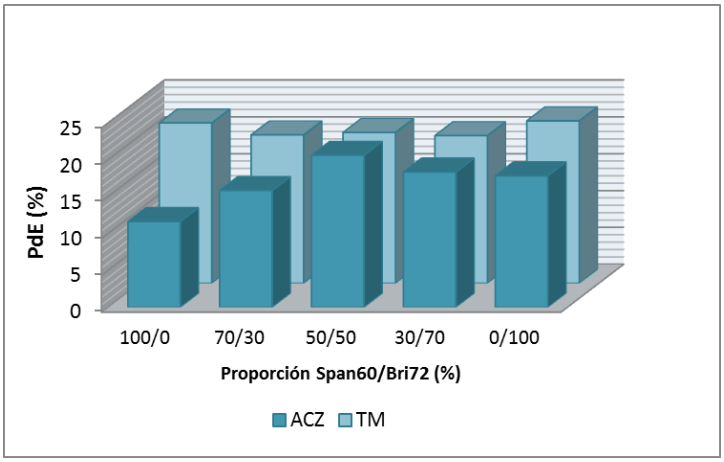


Figura 16. Relación del porcentaje de encapsulación (PdE) de ACZ y TM con la proporción de Span®60/Brij®72.

Ratio Span® 60/Brij® 72	Tamaño (nm)	PI	PZ (mV)
100/0	835,4 ± 62,1	1 ± 0	-28,1 ± 0,5
70/30	836,7 ± 111,5	1 ± 0	-16,4 ± 0,9
50/50	**2270,3 ± 100,2**	**0,5 ± 0,4**	**-13,9 ± 0,4**
30/70	882,9 ± 87,4	1 ± 0	-8,6 ± 0,9
0/100	2203 ± 78,8	0,8 ± 0,2	-3,2 ± 0,1

Tabla 16. Relación de la proporción de Span® 60 / Brij® 72 con las características fisicoquímicas de la formulación.

La proporción 50/50 Span® 60 / Brij® 72 mostró los mejores resultados en términos de PdE para ambos fármacos y IP. Sin embargo, las vesículas presentaron mayores tamaños y bajos valores de PZ, lo que sugiere cierto fenómeno inestabilidad. Para solventar este inconveniente, se recurre asiduamente a la incorporación de un agente que aporte carga a las vesículas para evitar su agregación y favorecer la estabilidad de la formulación. La inclusión de un agente portador de carga favorece, además, el porcentaje de encapsulación de principio activo, necesaria ya que, hay que señalar que estos resultados no mejoran los datos de eficiencia de atrapamiento con respecto a los estudios previos de liposomas.

Por ello, se elaboraron dos formulaciones adicionales con agentes con carga opuesta ya estudiados para otras vesículas (EA, DCP, 5 mg) con el fin de dilucidar la influencia de éstos sobre el porcentaje de encapsulación. La cantidad de CH (87,95 mg), la proporción Span® 60 / Brij® 72 (50/50) y concentración de ambos principios activos (0,5 mg/mL) se mantuvieron constantes. Como se observa en la Figura 17, la incorporación de estos portadores de carga mejoró el atrapamiento de ambos fármacos, mostrando mayor poder de encapsulación la EA. Sin embargo, a pesar de que TM debiera estar más influenciado por este parámetro porque se incorpora en fase orgánica junto al agente, los resultados respecto a ACZ fueron mejores que respecto a TM.

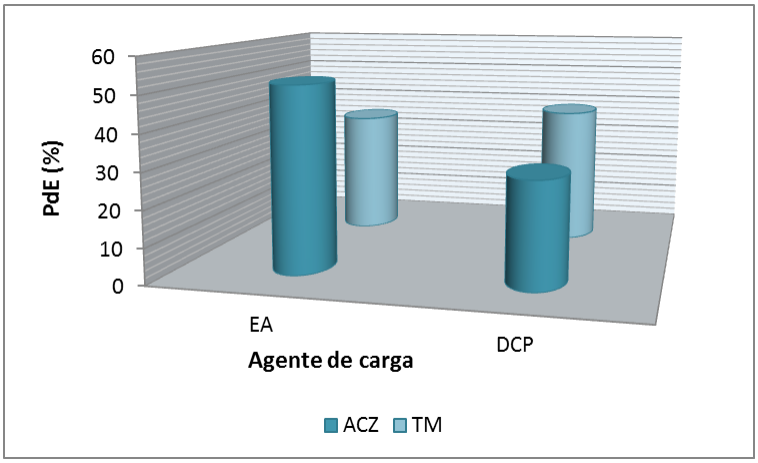


Figura 17. Relación del porcentaje de encapsulación (PdE) de ACZ y TM con el tipo de agente de carga.

Para analizar la influencia de la carga sobre la eficacia de encapsulación se incorporaron diferentes concentraciones de EA (2,5/4/5 mg), que fue el lípido seleccionado para los sucesivos estudios. Los resultados se recogen en la Figura 18 y como puede observarse, la cantidad de EA mejora el porcentaje de encapsulación de la ACZ, pero concentraciones muy altas podrían saturar la bicapa, dificultándose el atrapamiento. El PdE para ambos fármacos sigue una tendencia inversamente proporcional a la cantidad de EA incorporada en los niosomas, en concreto, valores más bajos de EA mejoran el PdE de TM.

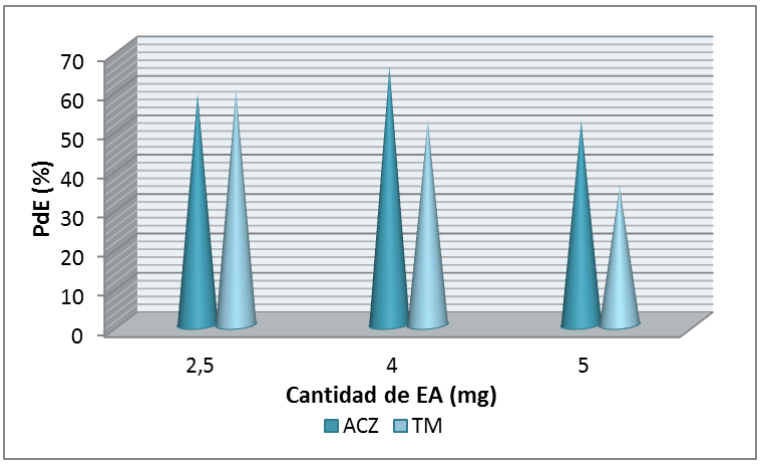


Figura 18. Relación del porcentaje de encapsulación (PdE) de ACZ y TM con la cantidad de estearilamina (EA).

Estos estudios permitieron establecer una formulación base que fue sometida a su optimización mediante DOE, obteniendo la formulación que se recoge en la tabla 17 que coincidía con la formulación que presentaba mejores valores de PdE durante el estudio de preformulación, con la que se realizaron los ensayos descritos a continuación, y queda recogida en la Tabla 17.

Componente	Fase lipídica	Fase acuosa
Span® 60	50 mg	-
Brij® 72	50 mg	-
Cloroformo	3,8 mL	-
Metanol	3,2 mL	-
CH	42,85 mg	
TM	1,5 mg	
Inductor carga positiva: EA	2,5 mg	-
Hepes pH 7,4	-	3 mL
ACZ		1,5 mg

Tabla 17. Composición de la formulación de niosomas. C: Colesterol. EA: Estearilamina. TM: Timolol maleato. ACZ: Acetazolamida.

La caracterización de la formulación optimizada está recogida en la Tabla 18.

Lote	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)	PdE (%)
Lote G (TM y ACZ)	382,0 ± 24,0	0,37 ± 0,16	33,9 ± 0,9	75,8(TM) 54,9 (ACZ)
Lote E (TM)	383,3 ± 28,8	0,26 ± 0,18	33,3 ± 0,8	69,6
Lote F (ACZ)	437,3 ± 39,6	0,61 ± 0,03	32,0 ± 0,7	47,2

Tabla 18. Caracterización formulación optimizada (Lote G) que incorpora ACZ y TM; y formulaciones con TM y ACZ por separado (Lote E y F, respectivamente).

4.2.2. Estudios de liberación in vitro

Este ensayo se realizó utilizando la formulación optimizada de ACZ y TM (Lote G) frente a soluciones control de ambos fármacos. Asimismo, se compararon con formulaciones similares que incorporaban los fármacos por separado (Lote E: sólo contiene TM; Lote F: sólo contiene ACZ). La metodología seguida fue la misma a la de los liposomas.

Los resultados muestran que la velocidad de liberación de ambos fármacos desde los niosomas fue obviamente más lenta que desde las soluciones estándar. El patrón observado (Figura 19) podría dividirse en dos etapas:

inicialmente una liberación con efecto *burst* a causa del fármaco libre contenido en la formulación, seguido de una liberación sostenida debido al fármaco encapsulado (Zhang et al., 2016). Como se observa en la Figura 19A, para TM, casi el 60% del fármaco se liberó en los primeros 60 minutos llegando a una liberación completa (98%) dentro de las 24 h. Sin embargo, para la liberación del 60% de ACZ hubo que esperar hasta los 120 minutos seguido por un 10% de liberación adicional dentro de las 24 h.

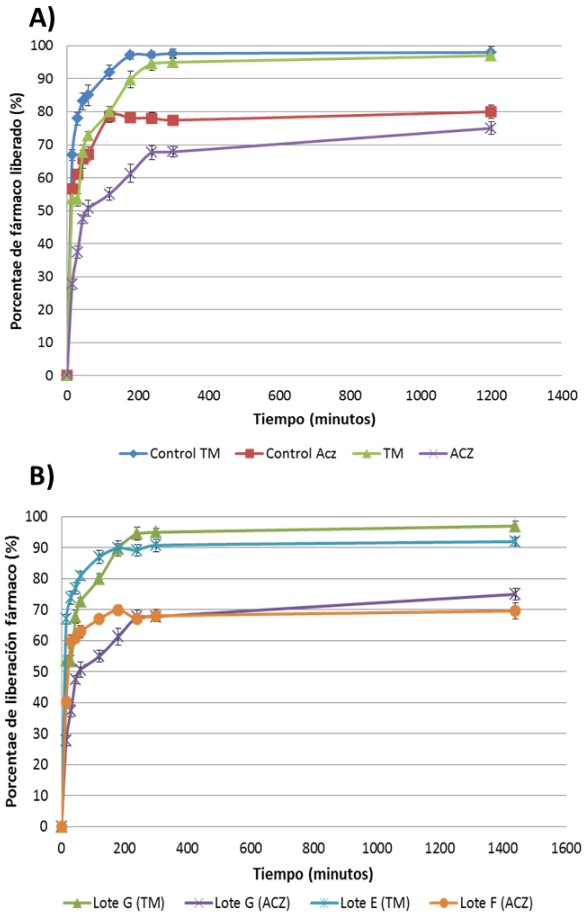


Figura 19. A) Liberación de niosomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula. B) Liberación de niosomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula (Lote G) y liposomas que incorporan TM (Lote E) y ACZ (Lote F) por separado.

Al igual que con ocurrió con las vesículas liposomales, se analizó la liberación que presentarían vesículas con las mismas características, pero encapsulando los fármacos independientemente uno del otro. Los resultados, recogidos en la Figura 19B, muestran que las vesículas con un solo fármaco presentaron

una liberación más rápida del fármaco, por lo tanto, menos favorable para el propósito de permeación sostenida. Al igual que ocurrió con los liposomas que incluían CDs, las vesículas que incluyen ambos fármacos presentan una cantidad total de fármaco permeado ligeramente superior.

4.2.3. Estudios de permeación in vitro

Los perfiles de permeación *in vitro* obtenidos están recogidos en la Figura 20A. Analizando los primeros 45 minutos, la cantidad de fármaco permeado desde los niosomas fue lineal, atribuible al efecto *burst* del fármaco libre en las formulaciones ya mencionado anteriormente en otros apartados. Después de este tiempo, fue evidente el comportamiento diferente de las muestras, produciéndose una permeación sostenida de ambos fármacos desde la formulación dentro de las cinco primeras horas, mientras que las soluciones presentaron una permeación más rápida. Se observa que el porcentaje y la tasa de fármaco que permeó desde los niosomas y sus respectivas soluciones estándar transcurridas 24 horas fueron similares, permeando antes el fármaco TM contenido en las vesículas respecto a ACZ.

Para analizar la influencia de incorporar ambos fármacos en la misma vesícula, se elaboraron niosomas que incorporaban cada uno de ellos de forma independiente. Los resultados quedan plasmados en la Figura 20B. Como puede observarse, los niosomas que encapsulan sólo uno de los fármacos presentaron también una permeación sostenida del fármaco, pero al final la formulación que incluye ambos permeó una cantidad superior de TM y ACZ a través de la membrana. Además, se observa que la permeación de la ACZ y TM se ve ralentizada cuando se incluyen en vesículas independientes, al contrario de lo que ocurría en los liposomas con ciclodextrina.

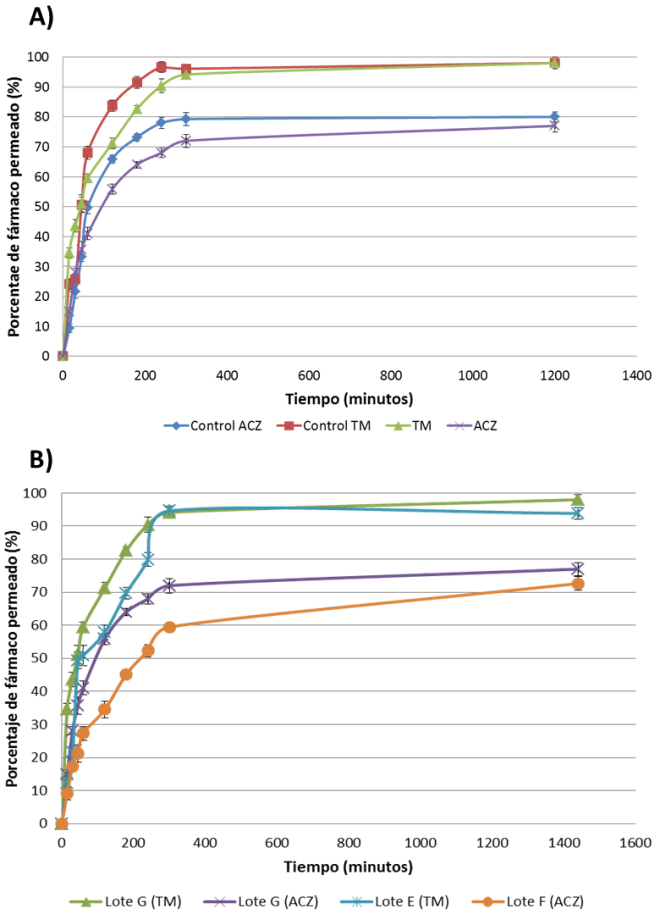


Figura 20. A) Permeación de niosomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula. B) Permeación de niosomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula (Lote G) y liposomas que incorporan TM (Lote E) y ACZ (Lote F) por separado.

Asimismo, los parámetros de permeación (Tabla 19) corroboraron los resultados explicados anteriormente, revelando que, en comparación con solución control, la incorporación del fármaco en las vesículas con tensioactivos no iónicos en la composición podría, al igual que ocurrió con los liposomas, reducir significativamente el J y P hasta un 50%. Se puede concluir del estudio que lote G, podría depositar menos TM y ACZ en su fase inicial que la solución control, permeando la misma cantidad de fármaco tras 24 h. En los lotes que incorporaron TM y ACZ por separado, se observa un ligero descenso en la cantidad de fármaco permeada tras 24 h.

Formulación	Cantidad permeada en 24 h ($\mu g/cm^2$)	J ($\mu g/cm^2 \cdot min$)	P (mm/h)
Solución control TM	156,05	1,1	0,70
Solución control ACZ	127,39	0,9	0,57
Lote G (TM)	156,05	0,8	0,51
Lote G (ACZ)	122,61	0,7	0,45
Lote E (TM)	149,44	0,8	0,51
Lote F (ACZ)	115,67	0,4	0,26

Tabla 19. Parámetros de permeación ocular. Lote G: liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula; Lote E y F: liposomas que incorporan TM y ACZ, respectivamente, por separado.

4.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LIPOSOMAS CON CD Y NIOSOMAS

Como se comentó con anterioridad, liposomas y niosomas constituyen diferentes alternativas de vesículas potencialmente eficaces que sirven como portadores de fármacos como TM y ACZ para el tratamiento del glaucoma. En ambas formulaciones, en liberación y permeación (Figuras 21 y 22) se observa un comportamiento similar para ambos fármacos. Sin embargo, respecto a ACZ, aunque a simple vista puede observarse una tendencia similar, los liposomas presentaron un aumento de la cantidad total liberada al medio debido a que incorporan 10 veces más cantidad de este fármaco (0,5 mg/mL de ACZ incorporada en niosomas frente a 5 mg/mL en liposomas). Dicho aumento se pudo llevar a cabo gracias a la presencia de HP-β-CD, que favorece el aumento de la solubilidad de la molécula, mejorando así la liberación y la permeación.

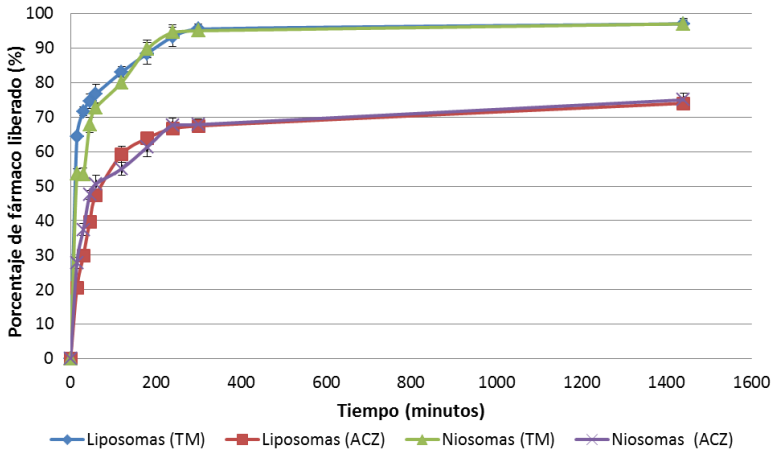


Figura 21. Liberación de TM y ACZ desde liposomas con CDs y niosomas.

Respecto a los perfiles de permeación *in vitro*, recogidos en la Figura 22, cabe destacar una velocidad de permeación de ACZ superior desde los niosomas respecto a los liposomas. Sin embargo, tras 24 horas de permeación los liposomas consiguen liberar un porcentaje más alto de fármaco.

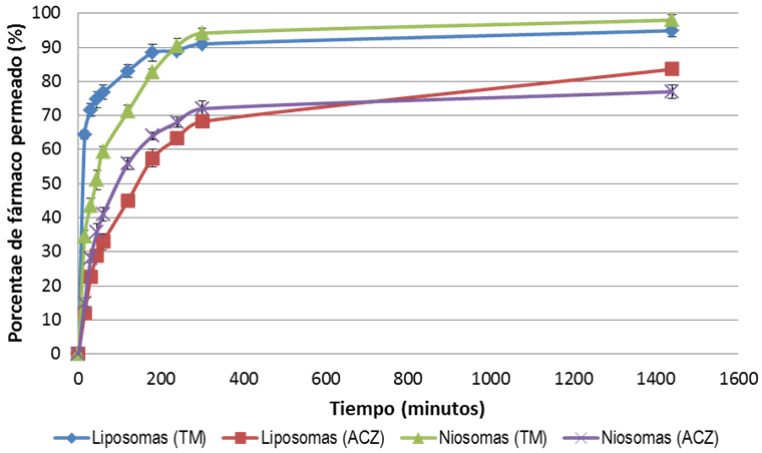


Figura 22. Permeación de TM y ACZ desde liposomas con CDs y niosomas

Para ACZ, el flujo (J) oscilo entre 5,6 y 0,7 µg/cm^2·min para liposomas (lote D) y niosomas (lote G), respectivamente; y el coeficiente de permeabilidad (K_p) se mantuvo entre 0,36 y 0,45 para liposomas y niosomas mm/h, respectivamente. Los resultados del flujo (Tabla 20) de los liposomas fueron 8 veces superiores a los niosomas. Esto es debido a que los liposomas incorporaban 10 veces más cantidad de ACZ. Sin embargo, coeficiente de permeabilidad fue ligeramente inferior en el caso de los liposomas.

Los resultados también revelaron que, para TM, los valores de flujo (J) y coeficiente de permeabilidad (P) se mantuvieron iguales para los 2 tipos de vesículas con valores de 0,8 µg/cm^2·min y 0,51 mm/h, respectivamente. Sin embargo, la cantidad permeada tras 24 h osciló entre 151,11 y 156,05 µg/cm^2·min para liposomas (lote D) y niosomas (lote G), respectivamente.

Se puede concluir del estudio que liposomas y niosomas podrían penetrar y controlar la tasa de permeación de ACZ y TM. El elevado flujo de los liposomas indicó que estas vesículas podrían constituir un reservorio de principio activo para prolongar el efecto de ACZ, de acuerdo con otros autores (Tsai et al., 2015).

Formulación	Cantidad permeada en 24 h ($\mu g/cm^2$)	J ($\mu g/cm^2 \cdot min$)	P (mm/h)
Lote D (TM)	151,11	0,8	0,51
Lote D (ACZ)	1330,89	5,6	0,36
Lote G (TM)	156,05	0,8	0,51
Lote G (ACZ)	122,61	0,7	0,45

Tabla 20. Parámetros de permeación ocular. Lote D: liposomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula; lote G: niosomas que incluyen TM y ACZ en la misma vesícula;

4.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE LA PIO EN ESTUDIOS IN VIVO

Se realizaron experimentos independientes en 10 conejos (n = 10) para evaluar el efecto hipotensivo de cada formulación. Se utilizaron como referencia dos soluciones estándar de TM y ACZ, con concentraciones de 0,5 y 1 mg/mL, respectivamente. Se probó una sola dosis en un solo animal cada día, y al menos, se aplicó un período de lavado de 48 horas entre cada experimento. El efecto de las formulaciones de TM y ACZ descritas en este estudio se comparó utilizando el efecto hipotensivo máximo del fármaco (%), el área bajo la curva del ΔPIO (%) en función del tiempo (h) de 0 a 7 horas (AUC), y el tiempo medio (h) en el que la duración del efecto hipotensor se mantuvo.

Se realizaron estudios *in vivo* con una formulación de liposomas sin incorporar HP-β-CD para comparar el efecto en ausencia de ésta. Como se observa en la Figura 23, la incorporación de ciclodextrina para mejorar la solubilidad de la ACZ pudiendo incorporar así un 10% más mejora significativamente la eficacia terapéutica de la formulación puesto que sin ésta no se observa mejora ninguna en la reducción de la PIO respecto a la solución control, por tanto, se corrobora, con estos resultados, el éxito que ha supuesto la incorporación de esta molécula en la formulación.

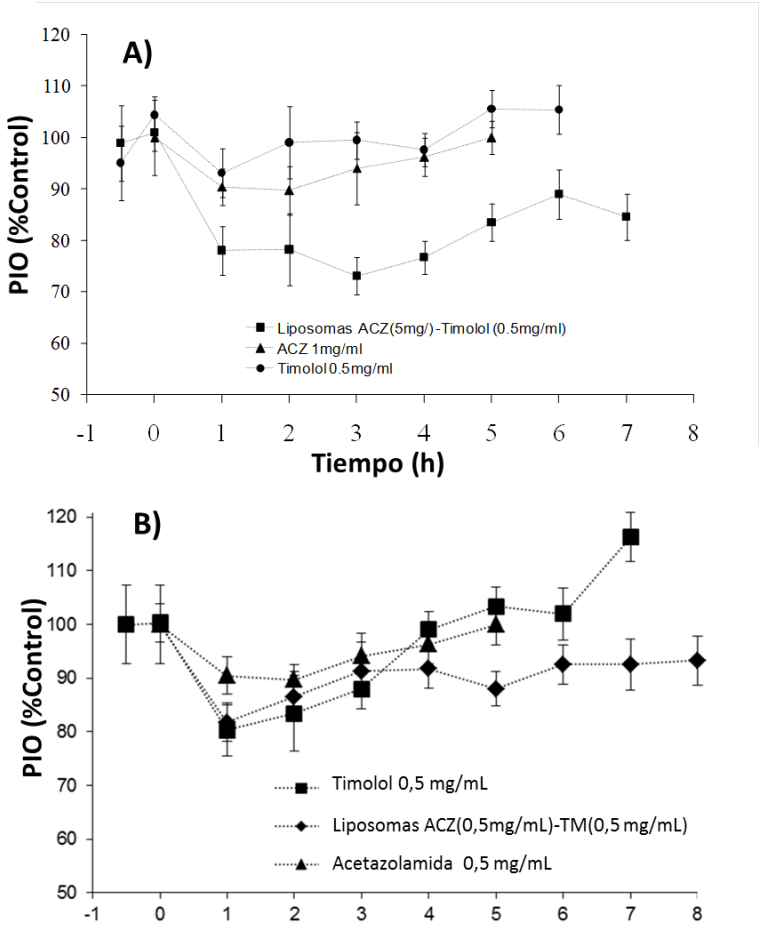


Figura 23. Perfiles de PIO de A) Liposomas que incorporan HP-β-CD; y B) Liposomas sin ciclodextrina.

Respecto a los resultados mostrados con la formulación de niosomas, ambos, liposomas con ciclodextrinas y niosomas fueron capaces de mantener el efecto hipotensor de TM y ACZ, proporcionando diferentes efectos máximos, alcanzando un porcentaje máximo de reducción de la PIO de prácticamente un 37% con los liposomas y un descenso de un 31% en el caso de los niosomas (Figura 24). Actualmente, la concentración de TM y ACZ usada comercialmente es 5 mg/mL y 250 mg cada 8 h, respectivamente, pero en los estudios *in vivo* realizados en los conejos, la eficacia demostró que el efecto hipotensor de TM (0,5 mg/mL) y ACZ (0,5 y 5 mg/mL en niosomas y liposomas, respectivamente, en ambas formulaciones se incrementó notablemente.

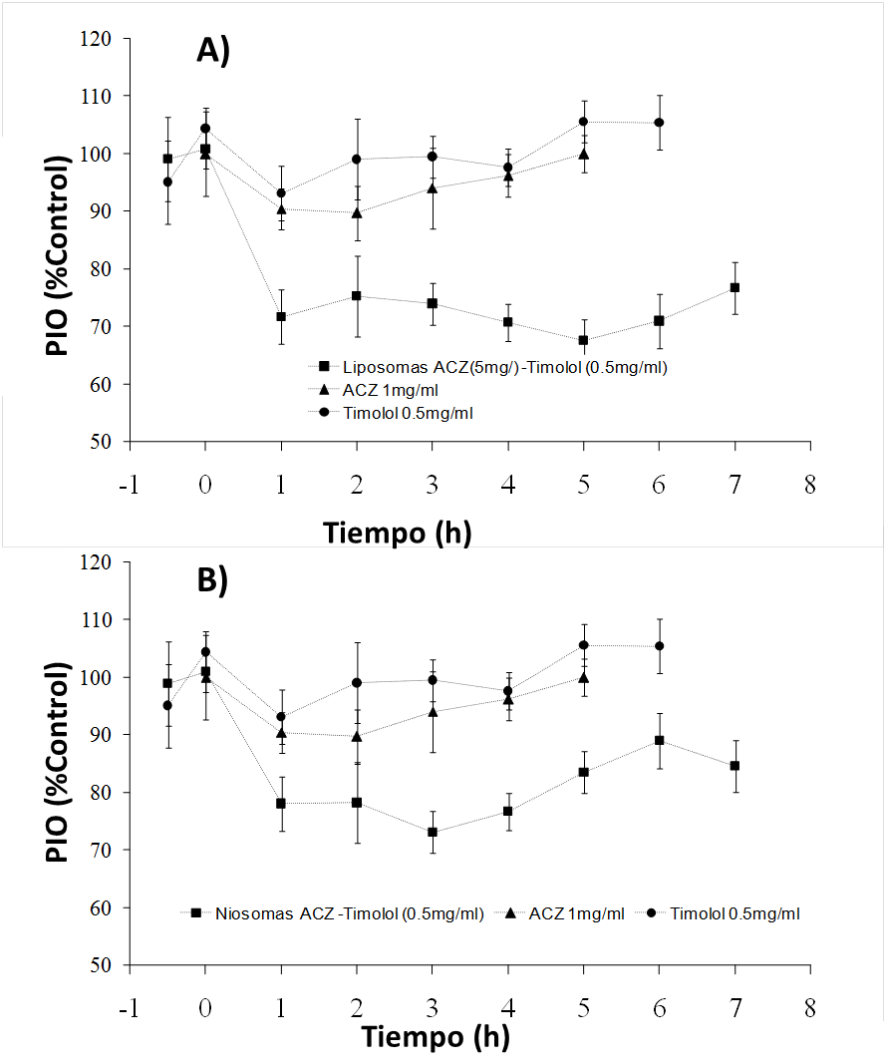


Figura 24. Perfiles de PIO de A) Liposomas que incorporan HP-β-CD; y B) Niosomas.

Teniendo como referencia la reducción de la PIO de las soluciones de referencia de 0,5 mg/mL TM (11,58 ± 2,58 de reducción de PIO) y 1 mg/mL ACZ (15,52 ± 3,44 de reducción de PIO), se obtuvieron diferencias significativas en el efecto hipotensor máximo con los liposomas (37,29 ± 2,86%) y con los niosomas (31,99 ± 3,24%), como se muestra en la Tabla 21. Por lo tanto, la eficacia de ambas formulaciones fue superior a la concentración de las soluciones estándar.

De los perfiles se desprende que el AUC de la solución (Figura 25) de TM 0,5 mg/mL y ACZ 1 mg/mL fue significativamente menor que los valores

obtenidos con liposomas y niosomas (126,89 ± 9,96 y 108,66 ± 15,32 %·h, respectivamente). Con respecto al efecto de tiempo medio (Tabla 21), la formulación de referencia de 0,5 mg/mL TM y ACZ duró aproximadamente 4 y 5 horas, respectivamente. Este efecto fue superado por ambas formulaciones, liposomas y niosomas, cuyo efecto duró aproximadamente, en ambos casos, 7 horas.

Formulación	Tiempo medio (h)	Reducción máxima de la PIO (%)	AUC_0^{7h} (%·h)
Solución de ACZ (1 mg/mL)	5	15,52 ± 3,44	24,44 ± 6,67
Solución de TM (0,5 mg/mL)	4	11,58 ± 2,58	38,1 ± 7,65
Liposomas	7	37,29 ± 2,86	126,89 ± 9,96
Niosomas	7	31,99 ± 3,24	108,66 ± 15,32

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos y farmacológicos evaluados de diferentes formulaciones. [TM] = 0,5 mg/mL.

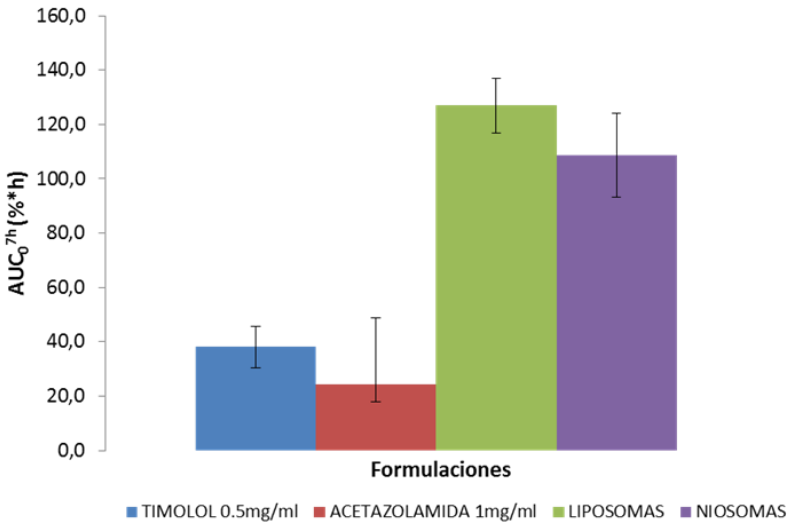


Figura 25. AUC_{07h} (%*h) de la solución [ACZ] 1 mg / mL y [TM] 0,5 mg / mL y liposomas con [TM] 0,5 mg / mL y [ACZ] 5 mg / mL; y niosomas con [TM] y [ACZ] 0,5 mg / mL

Por tanto, se mejoró el efecto hipotensor de la formulación en comparación con los *estudios in vivo* de las formulaciones que

contenían sólo el fármaco TM (Capítulo I) confirmándose el aprovechamiento del efecto sinérgico con la ACZ. Ambas formulaciones, liposomas con CD y niosomas tuvieron una eficacia similar obteniendo resultados ligeramente mejores con los liposomas con CDs. No obstante, cabe destacar que es una dosis 10 veces menor de ACZ incorporada en los niosomas.

5. DISCUSIÓN

Entre una extensa variedad de sistemas portadores de fármacos, los liposomas y derivados de éstos como los niosomas, se han estudiado ampliamente debido a su capacidad para incluir una gran variedad de fármacos liposolubles e hidrosolubles que, junto con su baja toxicidad y elevada biocompatibilidad constituyen un grupo de vesículas que mejoran potencialmente la eficacia terapéutica de moléculas en diversas patologías. El presente estudio fue diseñado para desarrollar y comparar dos tipos de vesículas, liposomas que incorporan derivados de ciclodextrinas (HP-β-CD) y niosomas, como vehículos de TM y ACZ para la administración tópica oftálmica en el tratamiento del glaucoma.

La obtención de formulaciones óptimas de liposomas capaces de atrapar en su interior una elevada concentración de principio activo, y que éstos presenten adecuadas propiedades de tamaño, homogeneidad en sus dimensiones y de carga superficial es, en muchas ocasiones, complicado. Y esta complejidad aumenta teniendo en cuenta las propiedades de ACZ en cuanto a solubilidad, que ha hecho necesario incorporarla en complejos de inclusión con HP-β-CD. La solubilidad en agua determinada experimentalmente del fármaco investigado incluido dentro de la cavidad de la HP-β-CD aumenta aproximadamente cinco veces. Aunque la experiencia del grupo de investigación en el campo de incluir complejos de fármacos con CDs en liposomas es amplia (Maestrelli et al., 2005; 2006), las particularidades de las formulaciones hacen que siempre se convierta en un reto cada estudio realizado. En este caso, y en base a experiencias previas, se propuso introducir en el diseño experimental variables de formulación relacionadas con la composición y conformación de la bicapa lipídica: obtención de formas unilaminares tras someter las muestras a extrusión o ciclos de FAT, modificación del agente de carga superficial y cantidad del mismo, e incluir ACZ en la bicapa además de formar parte del espacio acuoso

en forma de complejo. Los resultados han puesto de manifiesto la influencia mayoritaria de la concentración del agente de carga sobre la carga superficial de las vesículas, independientemente del compuesto utilizado. Cuando la concentración fue menor, los liposomas presentaron cargas más negativas, favoreciendo su repulsión. Además, esta concentración afectó favorablemente a la homogeneidad de la población, lo cual contribuiría también a la estabilidad de las muestras. Respecto al tipo de agente de carga, se seleccionaron dos en este estudio: EA y DDAB (Figura 26). Se trata de dos compuestos amínicos. La EA es una amina primaria (alquilamina), con una cadena saturada que aporta rigidez a la estructura de la bicapa (Figura 26A). Al tener una constante de disociación pKa 10,5, significa que a pH fisiológico al cual están formulados los liposomas, se encontraría en forma protonada (Villasmil et al., 2010). El DDAB es, al igual que la EA, un lípido anfifílico que aporta carga positiva a la superficie del liposoma, pero en este caso, es estructuralmente diferente (Figura 26B). Las diferencias estructurales afectan sobre todo a la distribución de los tamaños de las vesículas, de forma que la reducción en las dimensiones y en el IP se obtienen con el DDAB, al aportar mayor flexibilidad y mayor capacidad de empaquetamiento de la bicapa, como se ha demostrado en otros estudios (Asasutjarit, 2007).

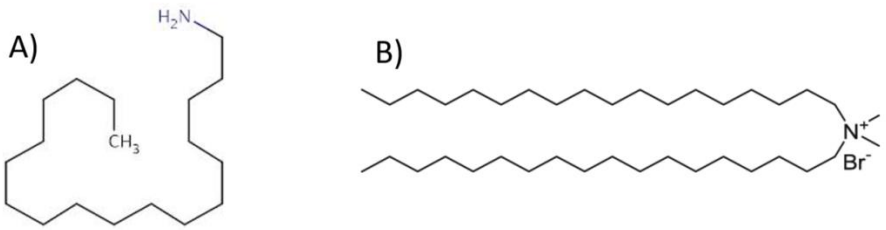


Figura 26. Estructuras de la EA (A) y del DDAB (B).

Por el contrario, la eficacia de encapsulación no se ve favorecida con la inclusión de DDAB en la formulación, según los resultados obtenidos, aunque la influencia no es muy significativa. Podría afectar a ello las características tensioactivas de este compuesto, que disminuye la tensión interfacial con el medio externo, favoreciendo la salida de ACZ al medio de disolución (Asasutjarit, 2007). No obstante, los PdE obtenidos han mejorado considerablemente los estudios previos llevados a cabo con este fármaco. A

modo de resumen, en la Tabla 22 se recopila la información obtenida en la etapa previa del *screening.*

	Método obtención LUVs	Agente de carga	Cantidad agente carga (mmol)	*Double-loading*
Potencial Z	**FAT** (4,6%)	-	**4** (87%)	-
Tamaño	**Extrusión** (59,3%)	**DDAB** (15,7%)	-	**No**
IP	**Extrusión** (14,1%)	**DDAB** (16,15%)	**4** (11,1%)	-
PDE	**FAT** (6,5%)	**EA** (5,7%)	-	-

Tabla 22. Resumen de la etapa de *screening* para las variables analizadas según ANOM y ANOVA. Entre paréntesis se recoge el porcentaje de contribución de los factores a las respuestas evaluadas.

Dada la variabilidad existente en las condiciones obtenidas para las distintas respuestas, la elección del lote óptimo se abordó de una manera subjetiva, de forma que es el decisor quien evalúa la importancia de cada respuesta respecto a su objetivo, basándose en la influencia estadística de los factores respecto a las respuestas.

A partir de estos datos, y considerando el grado de contribución estadística de los factores en las respuestas evaluadas desarrollado en el apartado 4.1.2 de este capítulo, se propone como lote óptimo para continuar los estudios aquél que posee DDAB como agente de carga, en una cantidad de 4 mmol y eliminando la metodología de *double-loading* como técnica para incrementar la encapsulación de ACZ. En este caso, no es favorable. Respecto a la selección de la técnica a emplear para obtener vesículas unilaminares, se seleccionó el método de extrusión por su elevado grado de contribución en el tamaño, factor clave para obtener resultados exitosos en la permeación de los fármacos a través de la córnea.

Respecto a los estudios previos de formulación desarrollados con los niosomas, se comprobó que la inclusión de un agente portador de carga, en concreto 2,5 mg de EA, favorece entre otras, el porcentaje de encapsulación

de principio activo. Con estos datos, se aplicó un DOE y se optimizó (datos no mostrados) dando como resultado una formulación optimizada que coincidió con la formulación que presentaba mejores valores de PdE durante los estudios previos.

Las formulaciones optimizadas tanto de liposomas como de niosomas se caracterizaron en términos de tamaño, IP, PZ y PdE. Los liposomas obtuvieron el tamaño esperado (200,6±1,6 nm) tras la extrusión por filtros de tamaño de poro de 200 nm. Por el contrario, los niosomas presentaron valores superiores (382,0 ± 24,0 nm), atribuibles a la fusión de las vesículas debido a la alta viscosidad de la formulación, hecho que se ve reflejado en los valores de 0,37 ± 0,16 de IP frente al 0,13 ± 0,04 de los liposomas. Respecto al PZ, ambas formulaciones presentaron buenos resultados de carga superficial (29,5 ± 0,3 y 33,9 ± 0,9 para liposomas y niosomas, respectivamente) con valores alejados de la neutralidad, positivos debido al DDAB incorporado en las vesículas liposomales y a la EA incluida en las vesículas elaboradas con tensioactivos no iónicos, factor que resulta interesante para la interacción con las cargas negativas de las células epiteliales de la córnea. Además, estos valores de PZ aportan estabilidad a las formulaciones. Respecto a la caracterización de las formulaciones que incorporaban TM y ACZ por separado, se obtuvieron resultados similares en la caracterización de las vesículas, pero cabe destacar, al contrario de lo que algunos autores han demostrado afirmando que la encapsulación simultánea de dos fármacos puede causar menor PdE probablemente debido a la competencia estérica del mismo mecanismo (Zhang et al., 2016), en este estudio ambos tipos de vesículas presentaron un ligero aumento en el PdE tanto de TM como ACZ al incorporarlos de forma simultánea.

Con estas formulaciones y las respectivas soluciones control, que contenían el fármaco en la forma libre, se realizaron estudios de liberación y permeación *in vitro* para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Comparando los resultados de formulaciones liposómicas y de niosomas de TM y ACZ, inicialmente presentaron una velocidad de liberación rápida debido al efecto del fármaco libre y al desprendimiento del fármaco de la superficie del liposoma, mostrando ambas una acción más sostenida que las soluciones control de TM y ACZ debido a la incorporación de los dos fármacos en las vesículas; estos nanosistemas permiten la liberación del fármaco lentamente desde las láminas internas durante un período de tiempo prolongado.

En el estudio comparativo respecto a las respectivas formulaciones que incorporaban el fármaco TM y ACZ por separado, en las formulaciones optimizadas que incorporaban ambos principios activos simultáneamente, se produce una mejora de la permeación total tras 24 horas. Cabe señalar que los resultados de la liberación *in vitro* son consistentes con los de porcentaje de encapsulación. En ambos casos, se empleó un medio de liberación que simulaba la composición y condiciones de la lágrima asegurando así la eficacia del estudio de liberación para garantizar que pudiesen extrapolarse los resultados a los posteriores estudios *in vivo.* En el caso del fármaco libre, el 70 y 80% de fármaco de ACZ y TM, respectivamente, se liberó dentro de los primeros 60 minutos, mientras que dicho porcentaje de TM liberado de liposomas y niosomas se mantuvo liberándose durante 3 y 5 horas, respectivamente. Para la ACZ hubo que esperar 10 h para que se produjese la liberación desde ambas formulaciones. El estudio de liberación *in vitro* de TM y ACZ no mostró efecto *burst*, por lo que el transporte del fármaco fuera de los liposomas fue impulsado principalmente por un mecanismo de difusión controlada, tal y como confirman en estudios de otros fármacos algunos investigadores (Stepniak et al., 2017).

Los perfiles de penetración ocular *in vitro* mostraron que la cantidad de TM y ACZ permeada desde los liposomas fue más alta que el fármaco libre. Además, respecto a la ACZ, hay que considerar que la cantidad total permeada es notablemente muy superior debido a que la concentración en los liposomas (5 mg/mL) es mayor que su respectiva solución estándar (0,5 mg/mL).

Para evaluar el efecto hipotensivo de las formulaciones ensayadas *in vitro*, se realizaron estudios *in vivo* en conejos. Se utilizaron como muestras control dos soluciones independientes de TM y ACZ (0,5 y 1 mg/mL, respectivamente). Se realizaron estudios *in vivo* con una formulación de liposomas sin incorporar HP-β-CD para comparar el efecto en ausencia de ésta. La incorporación de ciclodextrina para mejorar la solubilidad de la ACZ pudiendo incorporar así un 10% más mejora significativamente la eficacia terapéutica de la formulación puesto que sin ésta no se observa mejora ninguna en la reducción de la PIO respecto a la solución control, por tanto, se corrobora, con estos resultados, el éxito que ha supuesto la incorporación de esta molécula en la formulación. Respecto a los niosomas, estas vesículas con tensioactivos no iónicos mantuvieron el efecto hipotensor de TM y ACZ, alcanzando un descenso de la PIO de un 31% e, muy similar al prácticamente

37% de los liposomas, demostrando que el efecto hipotensor de TM (0,5 mg/mL) y ACZ (0,5 y 5 mg/mL en niosomas y liposomas, respectivamente) fue muy superior al control. Actualmente, la concentración de TM y ACZ usada comercialmente es 5 mg/mL y 250 mg cada 8 h, respectivamente. Además, se mejoró el efecto hipotensor de los estudios *in vivo* de las formulaciones que contenían sólo el fármaco TM (Capítulo I) atribuible al efecto sinérgico con ACZ. Ambas formulaciones, liposomas con CD y niosomas tuvieron una eficacia similar obteniendo resultados ligeramente mejores con los liposomas con CDs. No obstante, cabe destacar una dosis 10 veces menor de ACZ incorporada en los niosomas.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este trabajo, se expuso por primera vez la co-encapsulación de TM y ACZ en diferentes formulaciones utilizadas para la terapia del tratamiento del glaucoma.

En primer lugar, se desarrolló una formulación de liposomas que incorpora un derivado de ciclodextrinas, HP-β-CD, concluyéndose que:

1. La adición de la HP-β-CD en la formulación de liposomas de CH no ha resultado favorable, debido a la afinidad de la CD por el CH, provocando la desestructuración de la membrana y la disminución de la solubilización del fármaco por parte de la CD.
2. La sustitución del CH por un derivado de éste, hemisuccinato de colesterol (CHEMS) no presenta estas interacciones y aporta buenas características a la formulación.
3. Teniendo en cuenta la vía de administración a la que irá destinada la formulación, el proceso de extrusión resulta favorable para obtener liposomas con reducidos tamaños vesiculares.
4. En cuanto a los datos de eficacia de encapsulación, los valores de porcentaje de fármaco retenido se consideran adecuados, teniendo en cuenta resultados previos, lo cual indica que la complejación de ACZ con HP-β-CD ha sido favorable. El complejo HP-β-CD + ACZ mejora la solubilidad del fármaco mejorando asimismo la eficacia de encapsulación, llegando al 72% de encapsulación máxima en comparación con estudios previos de encapsulación de ACZ sin complejar, que se encontraba en el 22,0%. Estos porcentajes, traducidos en cantidades, suponen 3 mg/mL encapsulado frente a 0,14 mg/mL.
5. La optimización de las respuestas individuales llevadas a cabo a partir de los datos resultantes del diseño experimental permite determinar aquellos niveles de los factores que en teoría alcanzarían valores máximos para el PdE, tamaño, IP y PZ. La composición del lote final fue 0,0954 mmol PC, 0,0812 mmol CHEMS, 0,3 mmol HP-β-CD, 4 mmol DDAB, 1,5 mg TM y 15 mg ACZ (para 3 mL de formulación).

Los estudios demostraron que una composición basada en HP-β-CD/CHEMS/PC permitió una encapsulación satisfactoria de ambos fármacos,

con un tamaño de partícula adecuado para la administración ocular de fármacos.

A continuación, se desarrolló una formulación de vesículas con tensioactivos no iónicos derivados de liposomas, niosomas, de las que se pudo concluir:

1. La proporción 50/50 Span® 60 / Brij® 72 mostró los mejores resultados en términos de PdE para ambos fármacos y IP pero fue necesario incluir un portador de carga para mejorar la estabilidad de la formulación, siendo la EA la que mostró valores de PZ adecuados.
2. La formulación optimizada contiene 50 mg Span® 60, 50 mg Brij® 72, 42,85 mg CH, 2,5 mg EA, 1,5 mg TM y 1,5 mg ACZ (para 3 mL de formulación).

Los resultados *in vitro* e *in vivo* señalan que las formulaciones tienen la capacidad de actuar como portadores de fármacos efectivos actuando sinérgicamente tanto *in vitro* como *in vivo*, en conejos con glaucoma, con un prometedor control de la PIO, prolongando y mejorando la reducción de la PIO. Ambas proporcionan diferentes efectos máximos alcanzando un porcentaje máximo de reducción de la PIO de prácticamente un 37% con los liposomas y un descenso de un 31% en el caso de los niosomas. Estos resultados sugieren que agregar una pequeña dosis de ACZ podría mejorar la eficacia del tratamiento de esta patología.

La formulación resultante podría aplicarse como un prometedor sistema para terapia de pacientes con PIO elevada. La encapsulación de estos fármacos en las vesículas reduciría la dosis de fármaco y proporcionaría una liberación sostenida de ACZ y TM en vesículas co-cargadas evitando la administración frecuente de medicamentos. En este estudio, las vesículas co-cargadas mostraron una reducción significativa de la PIO debido a la contribución del TM en la reducción el humor acuoso y el papel clave de la ACZ inhibiendo la anhidrasa carbónica. Por lo tanto, la combinación de fármacos y su efecto a través de mecanismos duales de acción restauran los niveles de PIO fisiológicos para el tratamiento efectivo del glaucoma. Para concluir, la administración de ACZ y TM con la ayuda de un nanotransportador puede ser una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de esta patología ocular.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal D, Garg A, Kaur IP. Development of a topical niosomal preparation of acetazolamide: preparation and evaluation. J Pharm Pharmacol. 2004;56(12):1509–1517.

Aggarwal D, Pal D, Mitra AK, Kaur IP. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. Int J Pharm. 2007;338(1):21-26.

Ahn JH, Kim HD, Abuzar SM, Lee JY, Jin SE, Kim EK, Hwang SJ. Intracorneal melatonin delivery using 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin ophthalmic solution for granular corneal dystrophy type 2. Int J Pharm. 2017;529(1-2):608-616.

Aloisio C, Antimisiaris SG, Longhi MR. Liposomes containing cyclodextrins or meglumine to solubilize and improve the bioavailability of poorly soluble drugs. J Mol Liq. 2017;229:106-113

Alomrani AH, Shazly GA, Amara AA, Badran MM. Itraconazole-hydroxypropyl-b-cyclodextrin loaded deformable liposomes: in vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using Candida albicans as model. Colloids Surf. B. 2014;121:74–81.

Asasutjarit R, Lorenzen SI, Sirivichayakul S, Ruxrungtham K, Ruktanonchai U, Ritthidej GC. Effect of solid lipid nanoparticles formulation compositions on their size, zeta potential and potential for in vitro pHIS-HIV-Hugag Transfection Pharm. Res. 2007; 24(6):1098-1107.

Baydoun L, Furrer P, Gurny R, Müller-Goymann CC. New surface-active polymers for ophthalmic formulations: evaluation of ocular tolerance. Eur J Pharm. Biopharm. 2004;58(1):169-175.

Bhowmik M, Das S, Chattopadhyay D, Ghosh LK. Study of thermosensitive in-situ gels for ocular delivery. Scientia Pharmaceutica. 2011;79(2):351-358.

Biswal S, Murthy PN, Sahu J, Sahoo P, Amir F. Vesicles of non-ionic surfactants (niosomes) and drug delivery potential. Int J Pharm Sci Nanotechnol. 2008;1(1):1-8.

Blanco-Mendez J, Vila-Jato JL, Otero-Espinar FJ y Anguiano-Igea S. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. Drug Dev Ind Pharm. 1991; 17(7): 943-957.

Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(7):645-666.

Cal K, Centkowska K. Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. Eur J Pharm Biopharm. 2008;68(3):467-478.

Carafa M, Santucci E, Lucania G. Lidocaine-loaded nonionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. Int J Pharm. 2002;231(1):21-32.

Castile JD, Taylor KMG. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. Int J Pharm. 1999;188(1):87–95.

Cavalcanti IM, Mendonca EA, Lira MC, Honrato SB, Camara CA, Amorim RV, Mendes Filho J, Rabello MM, Hernandes MZ, Ayala AP, Santos-Magalhaes NS. The encapsulation of beta-lapachone in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. Eur J Pharm Sci. 2011;44(3):332-340.

Chen J, Lu S, Gu W, Peng P, Dong J, Xu F, Yang X. Characterization of 9-nitrocamptothecin-in-cyclodextrin-in-liposomes modified with transferrin for the treating of tumor. Int J Pharm. 2015;490(1):219-228.

Chen J, Lu WL, Gu W, Lu SS, Chen ZP, Cai BC, Yang XX. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs. Expert Opin Drug Deliv. 2014;11(4):565–577.

Cipolla D, Wu H, Eastman S, Redelmeier T, Gonda I, Chan HK. Development and characterization of an in vitro release assay for liposomal ciprofloxacin for inhalation. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;103(1):314-327.

Claro de Souza M, Marotta-Oliveira SSA, Rocha NHS, Eloy JO, Marchetti JM. Development of a method to evaluate the release profile of tamoxifen from

pegylated hybrid micelles. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2015;38(12):1223-1229.

DaneshamouzTabbakhian M, Daneshamouz S,Tavakoli N,Jaafari MR. Influence of liposomes and niosomes on the in vitro permeation and skin retention of finasteride. Ira J Pharm Sci 2005;1:119–30.

Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther. 1944;82(3):377-390.

El-Menshawe SF. A novel approach to topical acetazolamide/PEG 400 ocular niosomes. J Drug Delivery Sci Technol. 2012;22(4):295-299.

Eloy JO, Petrilli R, Topan JF, Antonio HMR, Barcellos JPA, Chesca DL, Marchetti JM. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016;141:74-82.

González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Rabasco AM. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. Drug Dev Ind Pharm. 2016;42(10):1683-1694.

Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. J Pharm Sci. 2012;101(10):3845-3863.

Graham SL, Shepard KL, Anderson PS, Baldwin JJ, Best DB, Christy ME, Freedman MB, Gautheron P, Habecker CN, Hoffman JM, Lyle PA, Michelson SR, Ponticello GS, Robb CM, Schwam H, Smith AM, Smith RL, Sondey JM, Strohmaier KM, Sugrue MF, Sarga SL. Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 2. Benzo(b)thiophenesulfonamide derivatives with ocular hypotensive activity. J Med Chem. 1989;32(12):2545-2548.

Granero GE, Longhi MR, Becker C, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for

immediate release solid oral dosage forms: Acetazolamide. J Pharm Sci. 2008;97(9):3691-3699.

Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide–HP-β-CD–TEA inclusion complex. Eur J Med Chem. 2008;43(3):464-470.

Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques, Adv. Anal. Chem. Instrum. 4. 1965:212-217.

Irie T, Fukunaga K, Yoshida A, Uekama K, Fales HM and Pitha J. Amorphous water-soluble cyclodextrin derivatives: 2-hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxyisobutyl, and carboxamidomethyl derivatives of beta-cyclodextrin. Pharm Res. 1988;5(11):713-717.

Jain CP, Vyas SP. Preparation and characterization of niosomes containing rifampicin for lung targeting. J Microencapsul. 1995;12(4):401-407.

Jara P, Cañete X, Lavayen V. Inclusion compounds of α - and γ – cyclodextrins with n-alkylamine (n = 12 , 18). J Chil Chem Soc. 2004;49(3):241-243.

Jóhannsdóttir S, Kristinsson JK, Fülöp Z, Ásgrímsdóttir G, Stefánsson E, Loftsson T. Formulations and toxicologic in vivo studies of aqueous cyclosporin A eye drops with cyclodextrin nanoparticles. Int J Pharm. 2017;529(1-2):486-490

Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular delivery: an overview. Int J Pharm. 2004;269(1):1-14.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D and Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. Int J Pharm. 2002;248(1):1-14.
Kaur IP,
Khamis EF, Abdel-Hamid M, Hassan EM, Eshra A, Elsayed MA. A stability-indicating first-derivative spectrophotometric assay of acetazolamide and its use in dissolution and kinetic studies. J Clin Pharm Ther. 1993;18(2):97-101.

Koide H, Okamoto A, Tsuchida H, Ando H, Ariizumi S, Kiyokawa C, Oku N. One-step encapsulation of siRNA between lipid-layers of multi-layer

polycation liposomes by lipoplex freeze-thawing. J Control Release. 2016;228:1-8.

Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery: an overview. Acta Pharm Sin B. 2011;1(4):208-219.

Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. Int J Pharm. 2013;453(1):167-180.

Lantz AW, Rodriguez MA, Wetterer SM, Armstrong DW. Estimation of association constants between oral malodor components and various native and derivatized cyclodextrins. Anal Chim Acta. 2006;557(1):184-190.

Li J, Guo C, Feng F, Fan A, Dai Y, Li N, Lu Y. Co-delivery of docetaxel and palmitoyl ascorbate by liposome for enhanced synergistic antitumor efficacy. Scientific reports. 2016;6:38787.

Liu L, Guo QX. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. J Incl Phenom Macrocycl Chem. 2002;42(1--2):1–14.

Loftsson T, Brewster ME, Derendorf H, Bodor N. 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin: properties and usage in pharmaceutical formulations. Pharm Ztg Wiss. 1991a;4(136):5-10.

Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int J Pharm. 2007;329(1):1–11.

Loftsson T, Hreinsdottir D and Masson M (2005) Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs.

Loftsson T, Hreinsdottir D, Masson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. Int J Pharm. 2005;302(1):18-28.

Loftsson T, Jarho P, Masson M, Jarvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2005b;2(2):335–351.

Loftsson T, Olafsdottir BJ, Bodor N. The effects of cyclodextrins on transdermal delivery of drugs. Eur J Pharm Biopharm. 1991b; 37(1):30-33.

López-Nicolás JM, Rodríguez-Bonilla P, García-Carmona F. Cyclodextrins and antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;54(2):251-76.

Lucio D, Irache JM, Font M, Martínez-Ohárriz MC. Supramolecular structure of glibenclamide and β-cyclodextrins complexes. Int J Pharm. 2017;530(1-2):377-386.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int J Pharm. 2006;312(1):53-60.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. Int J Pharm. 2005;298(1):55-67.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura, P. New “drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes” formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. Int J Pharm. 2010;395(1):222-231.

Marianecci C, Di Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, Carafa M. Niosomes from 80s to present: the state of the art. Adv Colloid Interface Sci. 2014;205:187-206.

Matloob AH, Mourtas S, Klepetsanis P, Antimisiaris SG. Increasing the stability of curcumin in serum with liposomes or hybrid drug-in-cyclodextrin-in-liposome systems: A comparative study. Int J Pharm. 2014;476(1):108-115.

Maus TL, Larsson LI, McLaren JW, Brubaker RF. Comparison of dorzolamide and acetazolamide as suppressors of aqueous humor flow in humans. Arch Ophthalmol. 1997;115(1):45-49.

McCormack B, Gregoriadis G. Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into liposomes: potential advantages in drug delivery. J Drug Target. 1994;2(5):449– 454.

Mehta SK, Jindal N. Formulation of Tyloxapol niosomes for encapsulation, stabilization and dissolution of anti-tubercular drugs. Colloids Surf B. 2013;101:434-441.

Mendes C, Buttchevitz A, Kruger JH, Kratz JM, Simões CMO, de Oliveira Benedet P, Silva MAS. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and β-cyclodextrin: Physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. Eur J Pharm Sci. 2016;83:71-78.

Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. J Control Release. 2014;185:22-36.

Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM. Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico (I). Ind Farm. 1994;9(5):71-76.

Paolino D, Sinha P, Fresta M, Ferrari M. Drug delivery systems. The Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentations. JG Webster Ed 2nd ed John Wiley & Sons. 2006. pp. 437-495.

Parasrampuria J, Das Gupta V. Preformulation studies of acetazolamide: effect of pH, two buffer species, ionic strength, and temperature on its stability. J Pharm Sci. 1989;78(10):855-857.

Pardakhty A, Moazeni E. Nano-niosomes in drug, vaccine and gene delivery: a rapid overview. Nanomed J. 2013;1(1):1-12.

Pitha J, Pitha J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. J Pharm Sci. 1985;74(9):987-990.

Rajera R, Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. Biol Pharm Bull. 2011;34(7):945-953.

Rodríguez I, Vázquez JA, Pastrana L, Khutoryanskiy VV. Enhancement and inhibition effects on the corneal permeability of timolol maleate: Polymers, cyclodextrins and chelating agents. Int J Pharm. 2017;529(1-2):168-177.

Rodriguez-Aller M, Guinchard S, Guillarme D, Pupier M, Jeannerat D, Rivara-Minten E, Gurny R. New prostaglandin analog formulation for glaucoma treatment containing cyclodextrins for improved stability, solubility and ocular tolerance. Eur J Pharm Biopharm. 2015;95:203-214.

Shilpa S, Srinivasan BP, Chauhan M. Niosomes as vesicular carriers for delivery of proteins and biologicals. Int J Drug Deliv. 2011;3(1).

Silver LH. Clinical efficacy and safety of brinzolamide (Azopt™), a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. Am J Ophthalmol. 1998;126(3):400-408.

Solanki AB, Parikh JR, Parikh RH. Formulation and optimization of piroxicam proniosomes by 3-factor, 3-level Box-Behnken design. AAPS PharmSciTech. 2007;8(4):43-49.

Song X, Feng L, Liang C, Gao M, Song G, Liu Z. Liposomes co-loaded with metformin and chlorin e6 modulate tumor hypoxia during enhanced photodynamic therapy. Nano Research. 2017;10(4):1200-1212.

Steed JW, Turner DR, Wallace K. Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry. John Wiley & Sons, 2007.

Stepniak A, Buczkowski A, Zavodnik L, Belica-Pacha S, Palecz B. Study of the interaction of β-cyclodextrin with albendazole in aqueous solutions. Journal of Molecular Liquids. 2017; 248:19-23.

Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem Rev. 1998;98(5):1743-1754.

Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure Appl Chem. 2004;76(10):1825–1845.

Traïkia M, Warschawski DE. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and 31P-nuclear magnetic resonance. Eur Biophys J. 2000;29(3):184-195.

Tsai MJ, Huang YB, Fang JW, Fu YS, Wu PC. Preparation and characterization of naringenin-loaded elastic liposomes for topical application. PloS one. 2015;10(7):e0131026.

Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte PJ, Heerklotz H. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. Biophysical Journal. 2005;89(2):1109-1119.

Uchegbu IF, Vyas SP. Nonionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. Int J Pharm. 1998;172(1):33-70.

Varan G, Varan C, Erdoğar N, Hıncal AA, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. Int J Pharm. 2017;531:457-469.

Varca GH, Andreo-Filho N, Lopes PS, Ferraz HG. Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. Curr Protein Pept Sci. 2010;11(4):255-263.

Vieira AC, Serra AC, Veiga FJ, Gonsalves, AM, Basit AW, Murdan S. Diclofenac-β-cyclodextrin for colonic drug targeting: In vivo performance in rats. Int J Pharm. 2016;500(1): 366-370.

Villasmil S, Dhrimeur W, Salas S, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. Drug Dev Ind Pharm. 2010;36(6):666-675.

Wang WX, Feng SS, Zheng CH. A comparison between conventional liposome and drug cyclodextrin complex in liposome system. Int J Pharm. 2016;513(1):387-392.

Yang Y, Gao J, Ma X, Huang G. Inclusion complex of tamibarotene with hydroxypropyl-β-cyclodextrin: Preparation, characterization, in-vitro and in-vivo evaluation. Asian J Pharms. 2017;12(2):187-192.

Zhang B, Wang T, Yang S, Xiao Y, Song Y, Zhang N, Garg S. Development and evaluation of oxaliplatin and irinotecan co-loaded liposomes for enhanced colorectal cancer therapy. Journal of Controlled Release. 2016;238:10-21.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. Biochim Biophys Acta. 2007;1768(6):1311-1324.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Se ha desarrollado un nuevo sistema vesicular deformable (transfersomas) con la finalidad de conseguir una adecuada liberación oftálmica del TM aplicando tres enfoques estadísticos para su optimización: medias marginales, análisis de regresión y redes neuronales siendo ésta última la mejor alternativa. La formulación optimizada de TM estaba compuesta por TM 0,5 mg/mL, PC 68 µmol, CH 20 µmol, Deo-Na 23,2 mmol, EA 18,56 mmol, adicionándose el fármaco en el compartimento acuoso de los liposomas.

2. E efecto combinatorio del potenciador de penetración (etanol) y el tensioactivo (Deo-Na) aumentó la elasticidad de las vesículas deformables. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados *in vivo*, los liposomas convencionales mostraron un mejor efecto hipotensor extendido en el tiempo enfatizando que el uso de una diez veces menor de TM mejora poderosamente los resultados farmacológicos y toxicológicos alcanzando un porcentaje máximo de reducción de la PIO de un 23 % con liposomas convencionales de TM frente al 11% de la solución de TM actualmente comercializada.

3. Se desarrolló y validó un método analítico mediante HPLC de fase inversa y condiciones de gradiente para la determinación simultánea de ACZ y TM en liposomas deformables, describiendo los parámetros de validación, bajo las pautas ICH, para lograr un método analítico con características aceptables de idoneidad y viabilidad. Además, el estudio realizado bajo los criterios de robustez estadística nos permitió identificar las condiciones cromatográficas óptimas; estableciendo los parámetros que tuvieron una influencia estadísticamente significativa para incluirlos como factores críticos y asegurar de este modo unos resultados fiables.

4. En este trabajo, se expuso por primera vez la co-encapsulación de TM y ACZ en diferentes formulaciones utilizadas para la terapia del tratamiento del glaucoma. Se desarrolló una formulación incluyendo ACZ, aplicando el Quality by Design para obtener una formulación optimizada en su espacio de diseño, con el fin de proveer un sistema de liberación que, por sus características, resulte adecuado para su administración oftálmica, maximizar la eficacia de encapsulación, el potencial zeta y permeación y minimizando el tamaño vesicular. La formulación optimizada estaba compuesta por TM 0,5 mg/mL, ACZ

0,5 mg/mL, PC 95,4 µmol, CH 81,2 µmol, Deo-Na 7,24 mmol, EtOH 1,5 % v/v. Con respecto a la ubicación de los fármacos en los compartimentos de los liposomas, los estudios realizados acerca de la eficacia de encapsulación de ambos activos muestran cómo la incorporación de ACZ en la fase acuosa y TM en la fase oleosa de las vesículas, proveen una mayor reproducibilidad interlote así como mejores eficacias de encapsulación.

5. En cuanto al ensayo de permeación, los transfersomas fueron embebidos en el gel de Carbopol® 940 que permitió aumentar el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular. Sin embargo, dificultó la permeación de los fármacos siendo más notable en el caso del fármaco con carga positiva, TM.

6. El método de evaporación en capa fina (TLE) proporcionó mejores respuestas en cuanto a tamaño vesicular, índice de polidispersión, estabilidad física y eficacia de encapsulación de ambos principios activos. Teniendo en cuenta la vía de administración a la que irá destinada la formulación, el proceso de extrusión resulta favorable para obtener liposomas con reducidos tamaños vesiculares.

7. Se desarrolló una formulación de liposomas que incorpora un derivado de ciclodextrinas, HPβCD. La adición de ésta en la formulación de liposomas de CH no ha resultado favorable, debido a la afinidad de la CD por el CH, provocando la desestructuración de la membrana y la disminución de la solubilización del fármaco por parte de la CD. La sustitución del CH por un derivado de éste, hemisuccinato de colesterol (CHEMS) no presenta estas interacciones y aporta buenas características a la formulación. El complejo HPβCD + ACZ mejora la solubilidad del fármaco mejorando asimismo la eficacia de encapsulación, llegando al 72% de encapsulación máxima en comparación con estudios previos de encapsulación de ACZ sin complejar, que se encontraba en el 22,0%. La composición del lote final fue 0,0954 mmol PC, 0,0812 mmol CHEMS, 0,3 mmol HPβCD, 4 mmol DDAB, 1,5 mg TM y 15 mg ACZ (para 3 mL de formulación). Se propone DDAB como agente de carga de forma que se obtiene una reducción en las dimensiones y en el IP, al aportar mayor flexibilidad y mayor capacidad de empaquetamiento de la bicapa.

8. El análisis térmico de los componentes de los liposomas arrojó como resultado una interacción entre principios activos y compuestos anfifílicos como la PC y el Deo-Na. Por ello, se desarrolló una formulación de vesículas con tensioactivos no iónicos derivados de liposomas, niosomas. La formulación optimizada contiene 50 mg Span®60, 50 mg Brij®72, 42,85 mg CH, 2,5 mg EA, 1,5 mg TM y 1,5 mg ACZ (para 3 mL de formulación).

9. Los resultados in vitro e in vivo de las formulaciones que co-administran ambos fármacos señalan que, ambas, tienen la capacidad de actuar como portadores de fármacos efectivos tanto in vitro como in vivo, en conejos con glaucoma, con un prometedor control de la PIO, prolongando y mejorando la reducción de la PIO alcanzando un porcentaje máximo de reducción de la PIO de un 37% con los liposomas deformables de TM y ACZ y un descenso de un 31% en el caso de los niosomas de TM y ACZ, superando así la formulación optimizada que contenía sólo TM y la solución comercializada actualmente.

10. Estos resultados sugieren que el efecto sinérgico de co-administración de fármacos agregando una pequeña dosis de ACZ podría mejorar la eficacia del tratamiento de esta patología. La encapsulación de estos fármacos en las vesículas reduciría la dosis de fármaco y proporcionaría una liberación sostenida de ACZ y TM en vesículas co-cargadas evitando la administración frecuente de medicamentos.

11. En este estudio, las vesículas co-cargadas mostraron una reducción significativa de la PIO debido a la contribución del TM en la reducción el humor acuoso y el papel clave de la ACZ inhibiendo la anhidrasa carbónica. Por lo tanto, la combinación de fármacos y su efecto a través de mecanismos duales de acción restauran los niveles de PIO fisiológicos para el tratamiento efectivo del glaucoma. Para concluir, la administración de ACZ y TM con la ayuda de un nanotransportador puede ser una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de esta patología ocular. La formulación resultante podría aplicarse como un prometedor sistema para terapia de pacientes con PIO elevada.

ANEXO I

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta tamaño vesicular antes de la extrusión.

ANOVA tables for Size (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
	Between	7,0E+07	15	4634000	231,7	*		<0,001	
	Within (error)	320000	16	20000					
	TOTAL	7,0E+07	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
A	Cholesterol (20 v 27)	1576000	1	1576000	78,8	*	-444	<0,001	2,3
B	Amount Egde Act (10 v 12)	942900	1	942900	47,2	*	343	<0,001	1,4
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	10470000	1	10470000	523,6	*	1144	<0,001	15
D	Drug (FO v FA)	5612000	1	5612000	280,6	*	-838	<0,001	8
E	-Cholesterol x Drug	316600	1	316600	15,8	*	-199	0,00	0,5
F	-Amount Egde Act x Drug	81880	1	81880	4,1	*	101	0,06	0,1
G	-EA x Type Edge	10650000	1	10650000	532,8	*	1154	<0,001	15,3
H	EA (Si v No)	12580000	1	12580000	629,0	*	-1254	<0,001	18
I	-Cholesterol x EA	304200	1	304200	15,2	*	-195	0,00	0,4
J	-Amount Egde Act x EA	333300	1	333300	16,7	*	204	<0,001	0,5
K	-Drug x Type Edge	10420000	1	10420000	520,9	*	1141	<0,001	14,9
L	-Drug x EA	8002000	1	8002000	400,1	*	-1000	<0,001	11,5
M	-Amount Egde Act x Type Edge	423400	1	423400	21,2	*	-230	<0,001	0,6
N	-Cholesterol x Type Edge	3323	1	3323	0,2		-20	0,69	0
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	7786000	1	7786000	389,3	*	987	<0,001	11,2
	Within (error)	320000	16	20000					
	TOTAL	69820000	31						

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta tamaño vesicular después de la extrusión.

ANOVA tables for Size (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
	Between	2,4E+04	15	1570	1779	*		<0,001	
	Within (error)	14,12	16	0,8828					
	TOTAL	2,4E+04	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
A	Cholesterol (20 v 27)	2605	1	2605	2950,0	*	-18	<0,001	11,1
B	Amount Egde Act (10 v 12)	674	1	674	763,9	*	-9	<0,001	2,9
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	941	1	941	1066,0	*	-11	<0,001	4
D	Drug (FO v FA)	481	1	481	545,2	*	8	<0,001	2
E	-Cholesterol x Drug	141	1	141	159,4	*	4	<0,001	0,6
F	-Amount Egde Act x Drug	1948	1	1948	2207,0	*	16	<0,001	8,3
G	-EA x Type Edge	5138	1	5138	5821,0	*	25	<0,001	21,8
H	EA (Si v No)	3589	1	3589	4066,0	*	-21	<0,001	15,2
I	-Cholesterol x EA	3653	1	3653	4138,0	*	-21	<0,001	15,5
J	-Amount Egde Act x EA	519	1	519	588,1	*	-8	<0,001	2,2
K	-Drug x Type Edge	397	1	397	449,6	*	-7	<0,001	1,7
L	-Drug x EA	1592	1	1592	1803,0	*	14	<0,001	6,8
M	-Amount Egde Act x Type Edge	980	1	980	1110,0	*	11	<0,001	4,2
N	-Cholesterol x Type Edge	887	1	887	1005,0	*	11	<0,001	3,8
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	8	1	8	9,2	*	-1	0,01	0
	Within (error)	14	16	1					
	TOTAL	23570	31						

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el IP antes de la extrusión.

ANOVA tables for IP (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
	Between	3,118	15	0,2078	17,67	*		<0,001	
	Within (error)	0,1882	16	0,01176					
	TOTAL	3,306	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% contrib
A	Cholesterol (20 v 27)	0,593	1	0,593	50,4	*	0,27	<0,001	17,9
B	Amount Egde Act (10 v 12)	0,036	1	0,036	3,1	*	-0,07	0,10	1,1
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	0,062	1	0,062	5,2	*	-0,09	0,04	1,9
D	Drug (FO v FA)	0,631	1	0,631	53,6	*	0,28	<0,001	19,1
E	-Cholesterol x Drug	0,121	1	0,121	10,3	*	-0,12	0,01	3,7
F	-Amount Egde Act x Drug	0,002	1	0,002	0,2		-0,02	0,69	0,1
G	-EA x Type Edge	0,482	1	0,482	41,0	*	0,25	<0,001	14,6
H	EA (Si v No)	0,054	1	0,054	4,6	*	-0,08	0,05	1,6
I	-Cholesterol x EA	0,006	1	0,006	0,6		-0,03	0,47	0,2
J	-Amount Egde Act x EA	0,020	1	0,020	1,7		-0,05	0,21	0,6
K	-Drug x Type Edge	0,088	1	0,088	7,5	*	-0,10	0,02	2,7
L	-Drug x EA	0,349	1	0,349	29,7	*	0,21	<0,001	10,6
M	-Amount Egde Act x Type Edge	0,003	1	0,003	0,2		-0,02	0,63	0,1
N	-Cholesterol x Type Edge	0,648	1	0,648	55,1	*	0,28	<0,001	19,6
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	0,022	1	0,022	1,8		-0,05	0,19	0,7
	Within (error)	0,188	16	0,012					
	TOTAL	3,306	31						

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el IP después de la extrusión.

ANOVA tables for IP (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
	Between	4,0E-02	15	0,002678	5,833	*		<0,001	
	Within (error)	0,007346	16	0,0004591					
	TOTAL	4,8E-02	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	0	1	0	1,4		0	0,26	1,3
B	Amount Egde Act (10 v 12)	0	1	0	0,2		0	0,67	0,2
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	0	1	0	0,0		0	0,83	0
D	Drug (FO v FA)	0	1	0	0,0		0	0,87	0
E	-Cholesterol x Drug	0	1	0	8,9	*	0	0,01	8,6
F	-Amount Egde Act x Drug	0	1	0	4,2	*	0	0,06	4
G	-EA x Type Edge	0	1	0	37,5	*	0	<0,001	36,2
H	EA (Si v No)	0	1	0	22,7	*	0	<0,001	22
I	-Cholesterol x EA	0	1	0	8,6	*	0	0,01	8,3
J	-Amount Egde Act x EA	0	1	0	0,0		0	0,83	0
K	-Drug x Type Edge	0	1	0	0,9		0	0,37	0,8
L	-Drug x EA	0	1	0	0,1		0	0,78	0,1
M	-Amount Egde Act x Type Edge	0	1	0	0,0		0	1,00	0
N	-Cholesterol x Type Edge	0	1	0	1,5		0	0,23	1,5
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	0	1	0	1,4		0	0,25	1,4
	Within (error)	0	16	0					
	TOTAL	0	31						

Tabla 5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el potencial zeta antes de la extrusión.

ANOVA tables for Zeta Potential (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
	Between	2,1E+03	15	139,2	816,1	*		<0,001	
	Within (error)	2,73	16	0,171					
	TOTAL	2,1E+03	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	21	1	21	124,4	*	-2	<0,001	1
B	Amount Egde Act (10 v 12)	11	1	11	65,4	*	-1	<0,001	0,5
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	61	1	61	359,1	*	3	<0,001	2,9
D	Drug (FO v FA)	52	1	52	302,3	*	3	<0,001	2,5
E	-Cholesterol x Drug	60	1	60	352,1	*	-3	<0,001	2,9
F	-Amount Egde Act x Drug	91	1	91	531,8	*	-3	<0,001	4,3
G	-EA x Type Edge	21	1	21	121,4	*	2	<0,001	1
H	EA (Si v No)	1064	1	1064	6238,0	*	-12	<0,001	50,9
I	-Cholesterol x EA	37	1	37	215,2	*	-2	<0,001	1,8
J	-Amount Egde Act x EA	30	1	30	177,3	*	-2	<0,001	1,4
K	-Drug x Type Edge	87	1	87	507,9	*	3	<0,001	4,1
L	-Drug x EA	40	1	40	235,3	*	2	<0,001	1,9
M	-Amount Egde Act x Type Edge	30	1	30	178,6	*	-2	<0,001	1,5
N	-Cholesterol x Type Edge	78	1	78	459,1	*	-3	<0,001	3,7
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	405	1	405	2374,0	*	-7	<0,001	19,4

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el potencial zeta después de la extrusión.

ANOVA tables for Zeta Potential (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
	Between	1,9E+03	15	126,4	1856	*		<0,001	
	Within (error)	1,09	16	0,068					
	TOTAL	1,9E+03	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	74	1	74	1083	*	-3	<0,001	3,9
B	Amount Egde Act (10 v 12)	85	1	85	1251	*	-3	<0,001	4,5
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	39	1	39	566	*	2	<0,001	2
D	Drug (FO v FA)	112	1	112	1640	*	4	<0,001	5,9
E	-Cholesterol x Drug	29	1	29	420	*	-2	<0,001	1,5
F	-Amount Egde Act x Drug	77	1	77	1131	*	-3	<0,001	4,1
G	-EA x Type Edge	68	1	68	1002	*	3	<0,001	3,6
H	EA (Si v No)	968	1	968	14210	*	-11	<0,001	51
I	-Cholesterol x EA	84	1	84	1231	*	-3	<0,001	4,4
J	-Amount Egde Act x EA	100	1	100	1463	*	-4	<0,001	5,3
K	-Drug x Type Edge	8	1	8	117	*	1	<0,001	0,4
L	-Drug x EA	22	1	22	322	*	2	<0,001	1,2
M	-Amount Egde Act x Type Edge	61	1	61	888	*	-3	<0,001	3,2
N	-Cholesterol x Type Edge	20	1	20	292	*	-2	<0,001	1
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	152	1	152	2225,0	*	-4	<0,001	8
	Within (error)	1	16	0					
	TOTAL	1898	31						

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para PdE antes de la extrusión.

ANOVA tables for EE (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
	Between	1,4E+04	15	959,1	2530	*		<0,001	
	Within (error)	6,065	16	0,3791					
	TOTAL	1,4E+04	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	4499	1	4499	11870	*	24	<0,001	31,3
B	Amount Egde Act (10 v 12)	698	1	698	1841,0	*	9	<0,001	4,8
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	346	1	346	912,1	*	-7	<0,001	2,4
D	Drug (FO v FA)	203	1	203	535,5	*	5	<0,001	1,4
E	-Cholesterol x Drug	19	1	19	50,5	*	-2	<0,001	0,1
F	-Amount Egde Act x Drug	278	1	278	732,2	*	6	<0,001	1,9
G	-EA x Type Edge	53	1	53	139,9	*	-3	<0,001	0,4
H	EA (Si v No)	1885	1	1885	4971,0	*	15	<0,001	13,1
I	-Cholesterol x EA	1876	1	1876	4948,0	*	-15	<0,001	13
J	-Amount Egde Act x EA	41	1	41	108,5	*	2	<0,001	0,3
K	-Drug x Type Edge	163	1	163	428,8	*	-5	<0,001	1,1
L	-Drug x EA	2422	1	2422	6389,0	*	-17	<0,001	16,8
M	-Amount Egde Act x Type Edge	1444	1	1444	3811,0	*	13	<0,001	10
N	-Cholesterol x Type Edge	373	1	373	982,8	*	7	<0,001	2,6
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	88	1	88	232,3	*	3	<0,001	0,6
	Within (error)	6	16	0					
	TOTAL	14390	31						

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para PdE después de la extrusión.

ANOVA tables for EE (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
	Between	2,4E+02	15	15,89	3148	*		<0,001	
	Within (error)	0,08077	16	0,005048					
	TOTAL	2,4E+02	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	2	1	2	484,3	*	-1	<0,001	1
B	Amount Egde Act (10 v 12)	3	1	3	601,3	*	1	<0,001	1,3
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	17	1	17	3275,0	*	-1	<0,001	6,9
D	Drug (FO v FA)	1	1	1	144,0	*	0	<0,001	0,3
E	-Cholesterol x Drug	5	1	5	1083,0	*	-1	<0,001	2,3
F	-Amount Egde Act x Drug	30	1	30	5880,0	*	2	<0,001	12,4
G	-EA x Type Edge	47	1	47	9300,0	*	2	<0,001	19,7
H	EA (Si v No)	11	1	11	2196,0	*	-1	<0,001	4,6
I	-Cholesterol x EA	46	1	46	9104,0	*	-2	<0,001	19,3
J	-Amount Egde Act x EA	9	1	9	1832,0	*	1	<0,001	3,9
K	-Drug x Type Edge	15	1	15	2894,0	*	-1	<0,001	6,1
L	-Drug x EA	1	1	1	177,9	*	0	<0,001	0,4
M	-Amount Egde Act x Type Edge	2	1	2	451,0	*	1	<0,001	1
N	-Cholesterol x Type Edge	25	1	25	5010,0	*	2	<0,001	10,6
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	24	1	24	4794,0	*	2	<0,001	10,1
	Within (error)	0	16	0					
	TOTAL	239	31						

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para los grupos fosfatos después de la extrusión.

ANOVA tables for Size (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
	Between	2,4E+04	15	1570	1779	*		<0,001	
	Within (error)	14,12	16	0,8828					
	TOTAL	2,4E+04	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	2605	1	2605	2950,0	*	-18	<0,001	11,1
B	Amount Egde Act (10 v 12)	674	1	674	763,9	*	-9	<0,001	2,9
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	941	1	941	1066,0	*	-11	<0,001	4
D	Drug (FO v FA)	481	1	481	545,2	*	8	<0,001	2
E	-Cholesterol x Drug	141	1	141	159,4	*	4	<0,001	0,6
F	-Amount Egde Act x Drug	1948	1	1948	2207,0	*	16	<0,001	8,3
G	-EA x Type Edge	5138	1	5138	5821,0	*	25	<0,001	21,8
H	EA (Si v No)	3589	1	3589	4066,0	*	-21	<0,001	15,2
I	-Cholesterol x EA	3653	1	3653	4138,0	*	-21	<0,001	15,5
J	-Amount Egde Act x EA	519	1	519	588,1	*	-8	<0,001	2,2
K	-Drug x Type Edge	397	1	397	449,6	*	-7	<0,001	1,7
L	-Drug x EA	1592	1	1592	1803,0	*	14	<0,001	6,8
M	-Amount Egde Act x Type Edge	980	1	980	1110,0	*	11	<0,001	4,2
N	-Cholesterol x Type Edge	887	1	887	1005,0	*	11	<0,001	3,8
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	8	1	8	9,2	*	-1	0,01	0
	Within (error)	14	16	1					
	TOTAL	23570	31						

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el ID después de la extrusión.

ANOVA tables for ID (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
	Between	4,2E+01	15	2,772	2381	*		<0,001	
	Within (error)	0,01863	16	0,001164					
	TOTAL	4,2E+01	31						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		l-hat	P-value	% cont
A	Cholesterol (20 v 27)	5	1	5	4019,0	*	-1	<0,001	11,3
B	Amount Egde Act (10 v 12)	1	1	1	1196,0	*	0	<0,001	3,3
C	-Cholesterol x Amount Egde Act	2	1	2	1543,0	*	0	<0,001	4,3
D	Drug (FO v FA)	1	1	1	1037,0	*	0	<0,001	2,9
E	-Cholesterol x Drug	1	1	1	481,8	*	0	<0,001	1,3
F	-Amount Egde Act x Drug	3	1	3	2956,0	*	1	<0,001	8,3
G	-EA x Type Edge	8	1	8	6701,0	*	1	<0,001	18,8
H	EA (Si v No)	6	1	6	4872,0	*	-1	<0,001	13,6
I	-Cholesterol x EA	6	1	6	5066,0	*	-1	<0,001	14,2
J	-Amount Egde Act x EA	1	1	1	1109,0	*	0	<0,001	3,1
K	-Drug x Type Edge	1	1	1	921,4	*	0	<0,001	2,6
L	-Drug x EA	3	1	3	2390,0	*	1	<0,001	6,7
M	-Amount Egde Act x Type Edge	2	1	2	1646,0	*	0	<0,001	4,6
N	-Cholesterol x Type Edge	2	1	2	1696,0	*	0	<0,001	4,7
O	Type Edge (Tw20 v Deoxi)	0	1	0	74,6	*	0	<0,001	0,2
	Within (error)	0	16	0					
	TOTAL	42	31						

Figura 1. Gráfico de las medias marginales para la respuesta tamaño vesicular antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión.

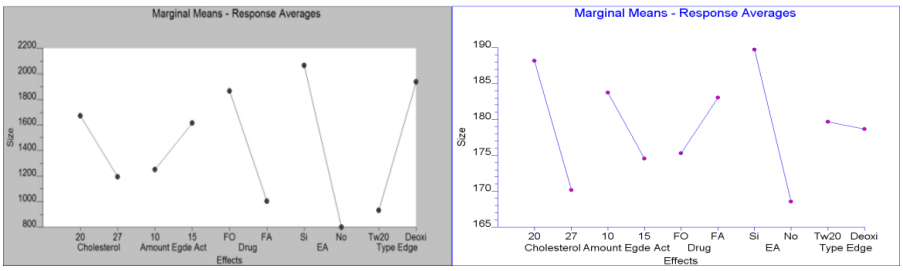


Figura 2. Gráfico de las medias marginales para la respuesta IP antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión.

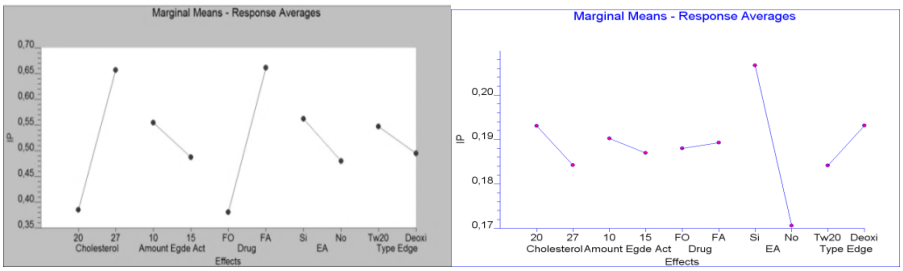


Figura 3. Gráfico de las medias marginales para la respuesta PZ antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión.

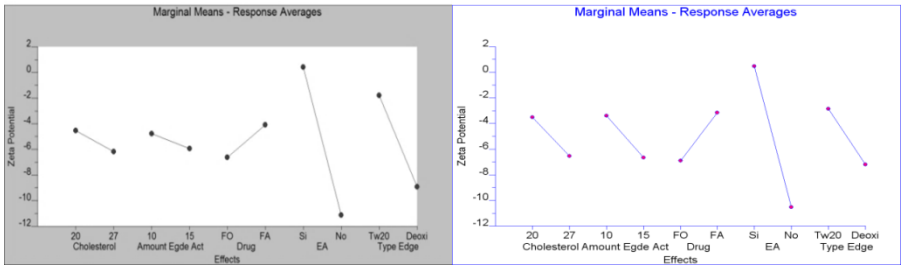
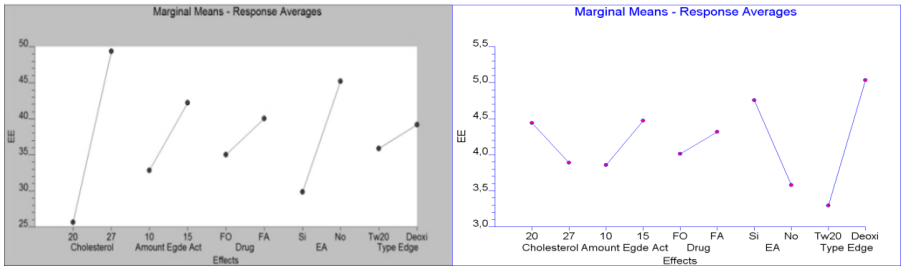


Figura 4. Gráfico de las medias marginales para la respuesta PdE antes (izquierda) y después (derecha) de la extrusión.



ANEXO II

Figura 1. Gráfico de los efectos principales ANOM para la respuesta tiempo de retención ACZ.

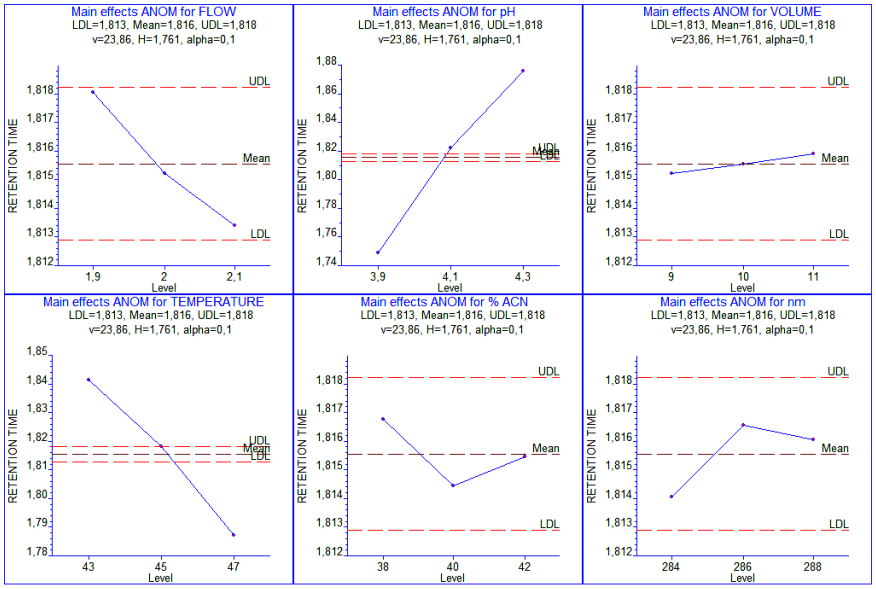


Figura 2. Gráfico de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva ACZ.

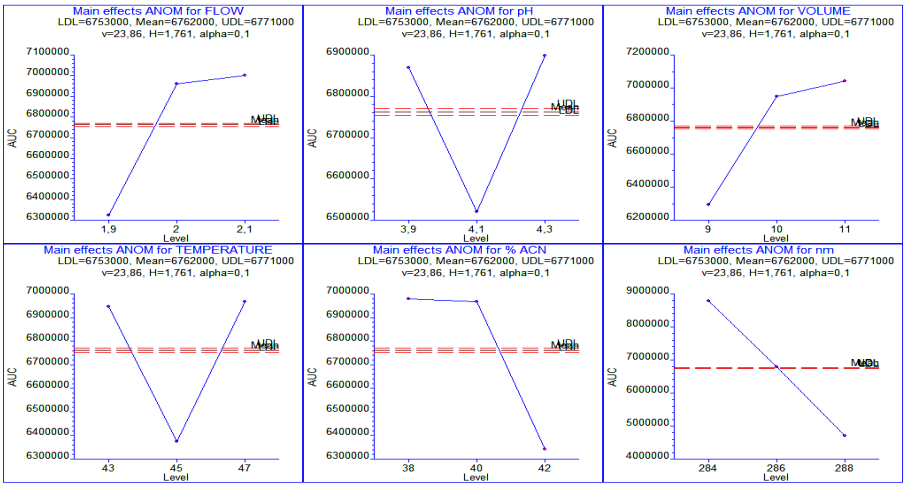


Figura 3. Gráfico de los efectos principales ANOM para la respuesta tiempo de retención de TM.

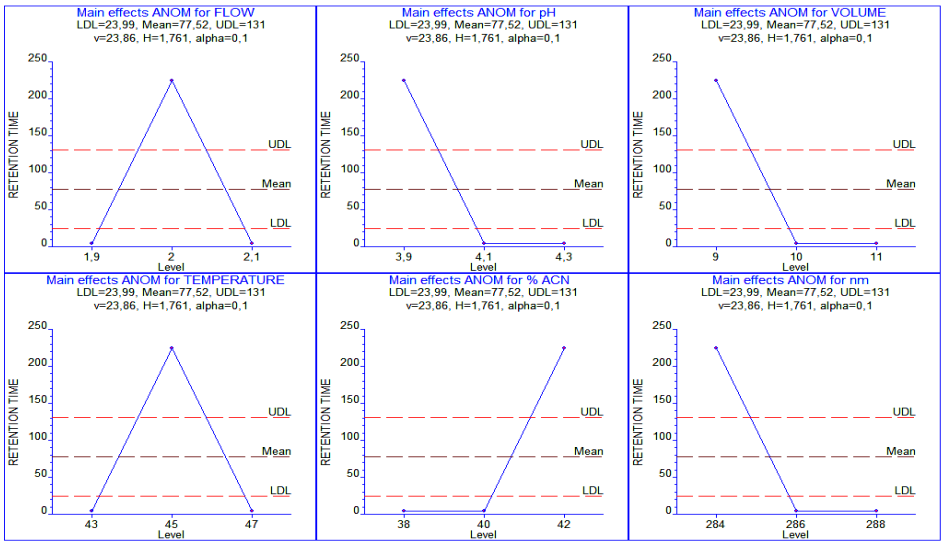


Figura 4. Gráfico de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva de TM.

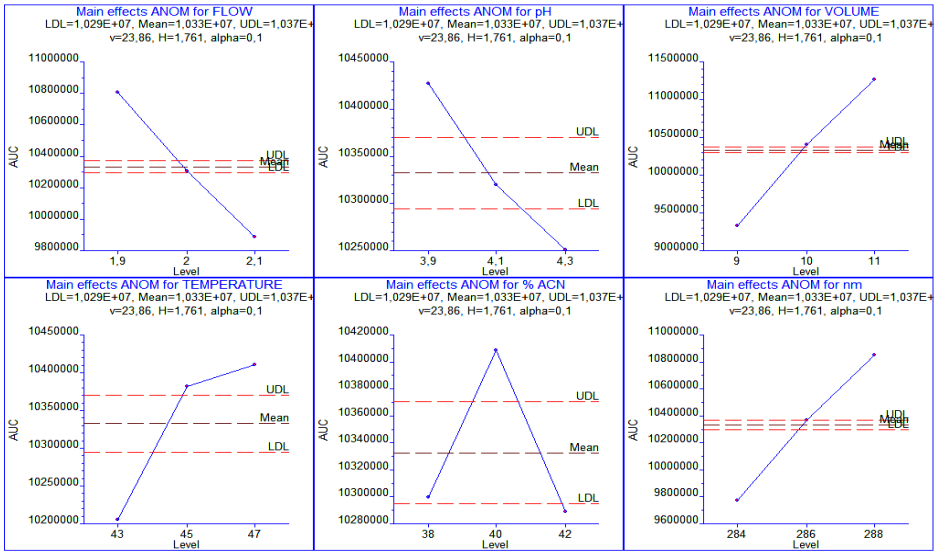


Tabla 1. Tabla ANOVA del efecto de factores e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención ACZ.

ANOVA tables for RETENTION TIME (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
	Between	1,7E-01	2,6E+01	6,6E-03	1,5E+02	*		<0,001	
	Within (error)	1,2E-03	2,7E+01	4,3E-05					
	TOTAL	1,7E-01	5,3E+01						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
A	Flow	2,0E-04	1,0E+00	2,0E-04	4,5E+00	*	-4,7E-03	0,04	0,1
B	Temperature	2,6E-02	1,0E+00	2,6E-02	6,0E+02	*	-5,4E-02	<0,001	15,3
C		0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		0,0E+00	1,00	0
D		4,9E-05	1,0E+00	4,9E-05	1,1E+00		-2,3E-03	0,30	0
E	pH	1,4E-01	1,0E+00	1,4E-01	3,3E+03	*	1,3E-01	<0,001	83,8
F		2,5E-05	1,0E+00	2,5E-05	5,7E-01		1,7E-03	0,46	0
G		5,6E-05	1,0E+00	5,6E-05	1,3E+00		2,5E-03	0,27	0
H		0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00	1,4E-01		-8,3E-04	0,71	0
I	% ACN	1,6E-05	1,0E+00	1,6E-05	3,7E-01		-1,3E-03	0,55	0
J	Volume	0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00	9,2E-02		6,7E-04	0,76	0
K		0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		0,0E+00	1,00	0
L	**Λ**	3,6E-05	1,0E+00	3,6E-05	8,3E-01		2,0E-03	0,37	0
M		0,0E+00	1,0E+00	0,0E+00	9,2E-02		-6,7E-04	0,76	0
	Within (error)	1,2E-03	2,7E+01	4,3E-05					
	TOTAL	1,7E-01	4,0E+01						

Tabla 2. Tabla ANOVA del efecto de factores e interacciones para la variable respuesta área bajo la curva ACZ.

ANOVA tables for AUC (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
	Between	1,98E+14	26	7,60E+12	9985	*		<0,001	
	Within (error)	2,06E+10	27	7,61E+08					
	TOTAL	1,98E+14	53						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
A	Flow	4,12E+12	1	4,12E+12	5411	*	676600	<0,001	2,4
B	Temperature	3,52E+09	1	3,52E+09	4,618	*	19770	0,041	0
C		1,05E+10	1	1,05E+10	13,84	*	34220	<0,001	0
D		3,99E+11	1	3,99E+11	524,2	*	210600	<0,001	0,2
E	pH	7,47E+09	1	7,47E+09	9,816	*	28820	0,004	0
F		3,56E+09	1	3,56E+09	4,68	*	-19900	0,04	0
G		3,00E+10	1	3,00E+10	39,36	*	57700	<0,001	0
H		3,62E+12	1	3,62E+12	4755	*	-634300	<0,001	2,1
I	% ACN	3,65E+12	1	3,65E+12	4789	*	-636500	<0,001	2,1
J	Volume	5,06E+12	1	5,06E+12	6652	*	750100	<0,001	3
K		2,82E+12	1	2,82E+12	3703	*	559700	<0,001	1,6
L	**λ**	1,49E+14	1	1,49E+14	195300	*	-4065000	<0,001	86,8
M		2,76E+12	1	2,76E+12	3626	*	553800	<0,001	1,6
	Within (error)	2,06E+10	27	7,61E+08					
	TOTAL	1,71E+14	40						

Tabla 3. Tabla ANOVA del efecto de factores e interacciones para tiempo de retención de TM.

ANOVA tables for RETENTION TIME (Response Averages) - Alpha level = 0,1								
One-Way ANOVA								
	Source	SS	DF	MS	F-ratio	l-hat	P-value	% contrib
	Between	7584000	26	291700	0,9999		0,499	
	Within (error)	7877000	27	291700				
	TOTAL	1,55E+07	53					
Single degree of freedom ANOVA								
	Source	SS	DF	MS	F-ratio	l-hat	P-value	% contrib
A	Flow	0,4234	1	0,4234	0	-0,2169	0,999	0
B	Temperature	0	1	0	0	-0,00078	1	0
C		437600	1	437600	1,5	220,5	0,231	3,8
D		437600	1	437600	1,5	-220,5	0,231	3,8
E	pH	437400	1	437400	1,499	-220,5	0,231	3,8
F		0,00035	1	0,00035	0	0,006278	1	0
G		437600	1	437600	1,5	220,5	0,231	3,8
H		0,00018	1	0,00018	0	-0,00444	1	0
I	% ACN	437200	1	437200	1,499	220,4	0,231	3,8
J	Volume	437600	1	437600	1,5	-220,5	0,231	3,8
K		437600	1	437600	1,5	220,5	0,231	3,8
L	**λ**	437600	1	437600	1,5	-220,5	0,231	3,8
M		0	1	0	0	-0,00067	1	0
	Within (error)	7877000	27	291700				
	TOTAL	1,14E+07	40					

Tabla 4. Tabla ANOVA del efecto de factores e interacciones para área bajo la curva de TM.

ANOVA tables for AUC (Response Averages) - Alpha level = 0,1									
One-Way ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
	Between	5,48E+13	26	2,11E+12	170,9	*		<0,001	
	Within (error)	3,33E+11	27	1,23E+10					
	TOTAL	5,51E+13	53						
Single degree of freedom ANOVA									
	Source	SS	DF	MS	F-ratio		I-hat	P-value	% contrib
A	Flow	7,59E+12	1	7,59E+12	615,2	*	-918000	<0,001	14
B	Temperature	3,80E+11	1	3,80E+11	30,79	*	205400	<0,001	0,7
C		9,64E+10	1	9,64E+10	7,816	*	103500	0,009	0,2
D		6,88E+10	1	6,88E+10	5,576	*	87400	0,026	0,1
E	pH	2,78E+11	1	2,78E+11	22,55	*	-175800	<0,001	0,5
F		6,19E+10	1	6,19E+10	5,017	*	-82910	0,034	0,1
G		3,02E+11	1	3,02E+11	24,48	*	-183100	<0,001	0,6
H		9,51E+09	1	9,51E+09	0,7712		-32500	0,388	0
I	% ACN	9,86E+08	1	9,86E+08	0,07997		-10470	0,779	0
J	Volume	3,39E+13	1	3,39E+13	2753	*	1942000	<0,001	62,6
K		6,21E+11	1	6,21E+11	50,35	*	-262600	<0,001	1,1
L	**λ**	1,04E+13	1	1,04E+13	843,5	*	1075000	<0,001	19,2
M		1,63E+11	1	1,63E+11	13,18	*	-134400	0,001	0,3
	Within (error)	3,33E+11	27	1,23E+10					
	TOTAL	5,42E+13	40						

ABREVIATURAS

Ace-Na: tampón acetato sódico trihidrato 0,05 M

ACN: acetonitrilo

ACV: aciclovir

ACZ: acetazolamida

ANFB: anfotericina B

ANOM: análisis de medias

ANOVA: análisis de varianza

AUC: área bajo la curva

BA: baicalina

BTM: butamben

BZC: benzocaína

CDs: ciclodextrinas

CH: colesterol

CHEMS: colesterol hemisuccinato.

CL: liposomas convencionales

CMC: concentración micelar crítica

CT: citarabina

CU: curcumina

DDAB: bromuro de dodecil dimetil amonio

DE: desviación estándar

Deo-Na: desoxicolato sódico

DF: Diclofenaco

DL1: Liposomas deformables

DL2: Liposomas deformables con etanol

DLS: Dynamic Light Scattering

DP: dicetilfosfato

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EA: estearilamina

EC: eficiencia de complejación

EDTA: sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: etanol

f2: factor de similitud

FAT: método de congelación-descongelación

FB: flurbiprofeno

GB: glibenclamida

GCV: ganciclovir

Hidr: tipo de hidratación

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HP-β-CD: hidroxipropil-β-ciclodextrina

HSM: platina caliente

HT: hidroclorotiazida

ID: índice de deformabilidad

INM: indometacina

IP: índice de polidispersión

IPL: iridotomía periférica con láser

J: flujo de permeación

K: factor de capacidad

K: factor de capacidad

Km:n: constante de estabilidad

LDL: límite inferior de control

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

LSS: lauril sulfato sódico

LT: latanoprost

LUVs: vesículas unilaminares grandes

MeOH/Cl3CH: relación metanol/cloroformo,

MLVs: vesículas multilaminares

MO: microscopía óptica

MPN: redes feed-forward, perceptrón multicapa o Multilayer Perceptron Network

MT: melatonina

MTX: metrotrexato

N: número de platos teóricos

NaCl: cloruro de sodio

NH4SCN: tiocianato de amonio

NS: niosomas

P: coeficiente de permeabilidad

PC: L-α fosfatidilcolina

PCD: coeficiente de reparto

PdE: porcentaje de encapsulación

PIO: presión intraocular

PP: papaína

PS: psoraleno

PZ: potencial Zeta

QbD: calidad por Diseño

REV: evaporación en fase reversa

RLM: análisis de regresión lineal múltiple

RNA: red Neuronal Artificial

RT: resveratrol

S/N: relación señal/ruido

Sa: varianza de la ordenada en el origen

Sb: varianza de la pendiente

SEo: error estándar de la ordenada

SMR: sulfamerazina

SUVs: vesículas unilaminares pequeñas

TC: temperatura de transición de fase

TC: terconazol

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

texp: valor experimental de Student-t

TLA: trabeculoplastia con láser de argón

TLE: técnica de evaporación en capa fina

TM: maleato de timolol

Tm: temperatura de transición de fase

tm: tiempo muerto

tR: tiempo de retención

TSL: trabeculoplastia selectiva con láser

ttab: valor tabulado de Student-t

Tw20: Tween® 20

UDL: límite superior de control

W: ancho de la banda

PUBLICACIONES

Titolo rivista/libro: Drug development and industrial pharmacy (Print)

Titolo articolo/sezione: Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process.

Autore/i: González-Rodríguez

ISSN: 0363-9045

DOI:

Anno: 2016

Volume: 42

Fascicolo: 10

Editore:

Pag. iniziale: 1683

Pag. finale: 1694

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Drug Development and Industrial Pharmacy

ISSN: 0363-9045 (Print) 1520-5762 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iddi20

Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process

M. L. González-Rodríguez, C. M. Arroyo, M. J. Cózar-Bernal, P. L. González-R, J. M. León, M. Calle, D. Canca & A. M. Rabasco

To cite this article: M. L. González-Rodríguez, C. M. Arroyo, M. J. Cózar-Bernal, P. L. González-R, J. M. León, M. Calle, D. Canca & A. M. Rabasco (2016) Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process, Drug Development and Industrial Pharmacy, 42:10, 1683-1694, DOI: 10.3109/03639045.2016.1165691

To link to this article: http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2016.1165691

Accepted author version posted online: 16 Mar 2016.
Published online: 06 Apr 2016.

DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, 2016
VOL. 42, NO. 10, 1683–1694
http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2016.1165691

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process

M. L. González-Rodríguez[a*], C. M. Arroyo[a*], M. J. Cózar-Bernal[a], P. L. González-R[b], J. M. León[b], M. Calle[b], D. Canca[b] and A. M. Rabasco[a]

[a]Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Seville, Spain; [b]Department of Industrial Management, School of Engineering, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ABSTRACT

The purpose of this work was to analyze the deformability properties of different timolol maleate (TM)-loaded transfersomes by extrusion. This was performed because elastic liposomes may contribute to the elevation of amount and rate of drug permeation through the corneal membrane. This paper describes the optimization of a transfersome formulation by use of Taguchi orthogonal experimental design and two different statistical analysis approaches were utilized. The amount of cholesterol (F1), the amount of edge-activator (F2), the distribution of the drug into the vesicle (F3), the addition of stearylamine (F4) and the type of edge-activator (F5) were selected as causal factors. The deformability index, the phosphorous recovery, the vesicle size, the polydispersity index, the zeta potential and percentage of drug entrapped were fixed as the dependent variables and these responses were evaluated for each formulation. Two different statistical analysis approaches were applied. The better statistical approach was determined by comparing their prediction errors, where regression analysis provided better optimized responses than marginal means. From the study, an optimized formulation of TM-loaded transfersomes was prepared and obtained for the proposed ophthalmic delivery for the treatment of open angle glaucoma. It was found that the lipid to surfactant ratio and type of surfactant are the main key factors for determining the flexibility of the bilayer of transfersomes. From *in vitro* permeation studies, we can conclude that TM-loaded transfersomes may enhance the corneal transmittance and improve the bioavailability of conventional TM delivery.

ARTICLE HISTORY
Received 28 October 2015
Revised 16 February 2016
Accepted 4 March 2016
Published online 6 April 2016

KEYWORDS
Deformability; extrusion; optimization; transfersome

Introduction

In the last decade, transfersomes have offered a versatile delivery concept to improve the stability and potentially compared to liposomes being useful for a wide range of drugs in order to increase their bioavailability[1–4]. They are ultradeformable lipid vesicles that putatively cross through a biological membrane under the influence of a transepidermal water activity gradient, which is based in the self-consistent theoretical model[5]. According to Cevc and Blume, the enhanced drug delivery from deformable liposomes is due to the driving force provided by the osmotic gradient force between the outer and inner layers of the membrane. The main difference between deformable liposomes and conventional lipid vesicles is the high adaptability stress-dependent of such flexible vesicles, which enable them to squeeze between the cells in the biological membranes, despite their large average vesicle size. Thus, they can cross through the intact membrane spontaneously under the influence of the hydration gradient that transcutaneously *in vivo*[6] occurs.

Unlike liposomes, transfersomes act as penetration enhancers. Vesicles owning better membrane deformability could penetrate the lipid membrane through the hydrophilic pathways or pores between the cells without losing their vesicle integrity. Meanwhile, liposomes with less flexible bilayers would fracture during transport through the pore. The mechanism could be ascribed to the presence of a surfactant providing good deformation properties to the vesicles. A biocompatible surfactant, also called edge-activator, destabilizes the lipid bilayer and causes an increase in its fluidity and elasticity, allowing spectacularly improved delivery of the encapsulated agent to and through the membrane[7]. Structurally, they have (quasi) metastable properties, which make the vesicle membrane ultra-flexible providing a high deformability that squeeze through pores in the membrane less than one-tenth of their own diameter when applied under non-occlusive conditions[8]. The combined mixture of appropriate lipids with membrane softening agents could enable transfersomes to penetrate pores that are sometimes smaller than their own diameters. Moreover, it is desirable that the ending diameters are maintained even after vesicles have passed through small pores, in absence of fragmentation[9].

The deformability represents one of the most important distinctive characteristics for transfersomes compared to other vesicles such as liposomes. It was suggested that deformable liposomes could respond to external stress by rapid shape transformations requiring low energy, spontaneously undergoing deformation to avoid the risk of structure rupture. Several methods to analyze the deformability or elasticity of the deformable liposomes have been reported in the literature, such as electron spin resonance[10], electron microscopy or ultrasounds[11]. However, the best-explored method for preparing lipid bilayer vesicles is the enforced extrusion of a crude lipid dispersion of liposomes through one or more nanoporous filters (Figure 1). The minimum pressure required for the lipids with a low bilayer lysis tension is relatively low. The

CONTACT M. L. González-Rodríguez malugoro@us.es Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain
*These authors contributed equally to this study.

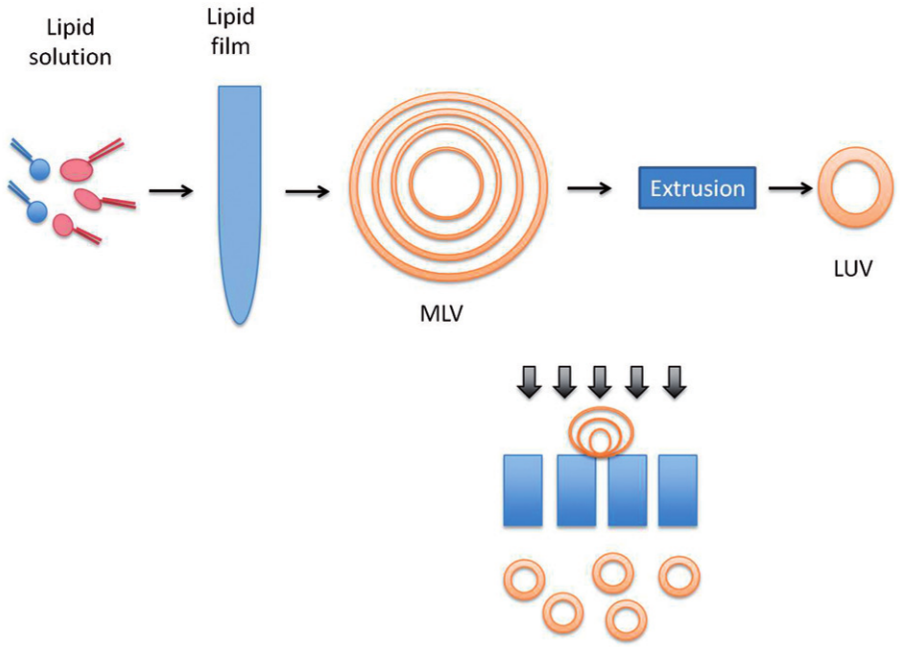


Figure 1. Schematic drawing of the extrusion mechanism. LUV formulations were generated after extruding MLV samples.

deformability index (DI) of the nanoliposomes, according to Van den Bergh assay, is calculated using the following formula: $DI = J_{flux} \cdot (r_v/r_p)2$, where J_{flux} is the rate of penetration through a membrane filter, r_v is the liposome size (after extrusion) and r_p is the pore size of the membrane, both of them in terms of radii. This strategy has been used by numerous authors[9,12,13]. A slight modification of this formula applies the measurement of the volume of pass-through the filter using a syringe and the percentage of the extruded volume was calculated as (volume after extrusion)/(initial volume)]·100[14].

For the ophthalmic route, Shen and Tu[15] proposed that deformable elastic liposomes can enter the corneal structure in a similar way to the stratum corneum.

Timolol maleate (TM) is a non-selective β-adrenergic receptor antagonist widely used for the treatment of open angle glaucoma. This drug acts lowering the intraocular pressure primarily by reducing the production of aqueous humor.

Ophthalmic TM is considered to be efficacious and well tolerated. However, the efficacy of the marketed ocular TM products is limited by extremely low bioavailability of the drug, frequent instillation and concomitant patient non-compliance. Approximately 80% of the topically applied dose drains through the nasolacrimal duct and is systemically absorbed. This causes adverse systemic effects such as cardiac, pulmonary, central nervous system, dermatological and gastrointestinal effects. These effects can be minimized using suitable carrier systems. In order to minimize the systemic absorption and enhance the ocular bioavailability of TM, several approaches have been developed, focusing overall in the increase of mean residence time on the ocular surface[16,17]. Other strategies allowed an improvement in the ophthalmic bioavailability using carriers that act as permeation enhancers[17–19]. In this regard, the use of elastic liposomes could make a noticeable contribution to the increase of the drug amount through the corneal membrane and also increasing the permeation rate of this process.

For this reason, the purpose of this work was to analyze the deformability properties of different TM-loaded transfersomes by means of extrusion mechanism. The study was focused on two parameters: the DI and phosphorous recovery. Several formulation factors were selected as critical variables affecting the deformability properties. Finally, the composition of transfersomes was optimized by applying two statistical approaches: marginal means and regression analysis, selecting it for further studies.

Methods

Chemicals and reagents

TM, Tween® 20, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ammonium thiocyanate, ferric chloride, sodium chloride and sodium lauryl sulfate were received from Acofarma (Spain). Acetonitrile (ACN), chloroform, methanol and 2-[4 (2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (Hepes) were obtained from Panreac Química (Spain). Cholesterol (CH), sodium deoxycholate (Deo-Na) and egg L-α phosphatidylcholine (EPC) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Deionized water was used and purified using a Milli-Q system (Millipore). Stearylamine (SA) was obtained from Fluka Biochemika (Buchs, Switzerland).

Preparation of ultradeformable liposomes

TM-loaded liposomes containing edge-activator compounds were prepared using the thin-film dispersion method. The lipid phase, consisting of a mixture of EPC (68 μmol) and CH (20 or 27 μmol) was dissolved in chloroform (4.8 mL) in a round-bottom flask. Edge-activators (Deo-Na or Tween® 20) were completely dissolved with TM (depending on formulation) in methanol (3.2 mL). After mixing both solutions, the organic solvent was then removed using a rotary evaporator (Büchi Rotavapor R-210 with Heating Bath Buchi B-491) in a 58 °C water bath under vacuum. The dried lipid film was maintained under reduced pressure for 2 h to remove traces of solvent. This film was then hydrated with 3 mL of Hepes buffer pH 7.4/EDTA (1 mM) containing 1.5 mg/mL of TM following five cycles of vortex, consisting in stirring for 2 min and heating at 58 °C for 5 min until vesicles were formed.

The temperature was maintained at 58 °C until the end of the process, above the gel-liquid transition temperature (T_c) of the amphiphilic and lipid substances. All formulations (MLVs) were quickly sealed in glass containers and stored in the dark at 4 °C.

Deformability index

The DI of the prepared transfersomes was measured after extruding MLVs transfersomes. Unilamellar vesicles were obtained from this procedure, when the samples passed through 800 nm pore sized polycarbonate membrane filters equipped in a Lipex Thermobarrel extruder (Northern Lipids Inc., Burnaby, Canada) under air flow, as previously reported[20]. Once the samples were extruded by 800 nm filter for six times, they were diluted until 1.5%w/v of lipids with respect to the recovered volume after this extrusion process. The DI was calculated from de flux (J_{flux}) of sample through the filter and the diameter ratio between the measured size and pore size. The J_{flux} was obtained by extruding the above formulation, previously treated with 800 nm filter, through a polycarbonate filter with a pore diameter of 100 nm (r_p) by applying a pressure of 600 psi, for 10 min. The averaged liposome diameter after extrusion (r_v) was measured by DLS.

The elasticity of the deformable liposomes was obtained as follows:

$$\text{Elasticity} = J_{flux} \cdot \left(\frac{r_v}{r_p}\right)^2$$

Where, J_{flux} is the rate of penetration through a membrane filter; r_v is the liposome size (after extrusion); and r_p is the pore size of the membrane.

Phosphorous content

The structural integrity of the membranes after the extrusion depends, among other factors, on the phospholipid recovery. Therefore, this study has been focused on the quantification of EPC content in the samples after the extrusion procedure, which was analyzed by using the Stewart assay[21].

Stewart assay is based on the ability of phospholipids to form a complex with ammonium ferrothiocyanate. The advantage of this method is that the presence of inorganic phosphorous does not interfere with this assay and therefore PBS buffer or other phosphate buffers can be used. The protocol has been previously described by Zuidam et al.[22]. Briefly, a standard solution (0.1 M) of ammonium ferrothiocyanate was used. It was prepared by dissolving 27.03 g ferric chloride hexahydrate ($FeCl{\cdot}6H_20$) and 30.4 g ammonium thiocyanate (NH·SCN) in deionized distilled water and making up to 1 L. Simultaneously, a standard solution (0.1 mg/mL, 10 mL) of EPC in chloroform was prepared. The complexation reaction between solutions was performed in the presence of chloroform. After making a calibration curve, the same procedure has been applied with test samples to spectrophotometrically quantify the phospholipid content.

Vesicle size and zeta potential

The vesicle size was determined by dynamic light scattering technique using a Zetamaster apparatus (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The parameters for measurement and calculation were set as follows: 1.33 refractive index, 25 °C temperature and water as dispersant. To measure the vesicle size, 200 μL of liposome dispersions were suitably diluted with 20 mL of purified water to avoid multiscattering phenomena. The sample was immediately sized by photon correlation spectroscopy and the intensity of the laser light scattered by the samples was detected at an angle of 90° with a photomultiplier.

For each batch of liposomal dispersion, three independent samples were analyzed, each of which was measured at least twice and up to five times. The data accumulation was performed in a series of subruns, 10 subruns by each run. Finally, five runs were analyzed using a Contin method, which is a lower resolution algorithm (Malvern Instruments manual). On the basis of this analysis, the *z*-average value was obtained enabling the approximation of the hydrodynamic diameter (nm) of liposomes. The polydispersity index (PdI) allows us to determine the level of homogeneity between different sizes of particles. A small value of PdI (<0.2) indicates a homogeneous vesicle population, whereas a larger PdI (>0.3) indicates heterogeneity.

To measure zeta potential (*Z*), dispersions (3 mL) were diluted with purified water and then injected into a photoelectric cell. The movement of liposome within the electric field allows us to determine their electric charge. The *Z* was determined by electrophoretic mobility (μ) measurements. The mobility μ was converted to *Z* by the Smoluchowski equation:

$$Z = \mu\eta/\varepsilon$$

Where, η is the viscosity and ε is the permittivity of the solution. For each batch, at least five independent samples were taken, each of which was analyzed at least three times.

Percentage of drug entrapment (PDE)

TM entrapped within the transfersomes was estimated after removing the unentrapped drug by centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804 R) at 8000 rpm at 4 °C for 60 min[23,24]. The whole supernatant was filtered and analyzed by HPLC for the drug content. The drug loading within the liposomes was analyzed by dissolving the liposomal pellet in 1 mL of sodium lauryl sulfate 0.5% p/v. After submitting the sample to a sonication process (VWR Ultrasonic cleaner) for 10 min and filtering, the amount of encapsulated drug was chromatographically quantified.

The chromatographic apparatus consisted of a Hitachi Elite LaChrom equipped with a L-2130 isocratic pump, a diode array detector L-2455 and a L-2200 autosampler. For data collection and calculation, we used an EZChromElite Data System Software Manager. The chromatographic conditions were optimized using a C18 column (Merck, RP-18 LichroCART® 150 mm × 4 mm, 5 μm), isocratic method with mobile phase of ACN and sodium acetate (0.05 M) adjusted to pH 4.1 in 30/70 ratio (v/v), nitrocellulose filter of 0.22 μm-membrane (Millipore, Barcelona, Spain) to filter the mobile phase, flow rate 2 mL/min, injection volume 10 μL, oven temperature of 45 °C ± 1. The analysis was performed at room temperature at 295 nm.

Screening and optimization stages

For the screening stage, an orthogonal array L16 Taguchi was selected. In this particular case, this array corresponds to 2^(5–1) half-fraction factorial design of resolution V. Therefore, main effects would be confounded with four-factor (or higher-order) interactions, and two-factor interactions would be confounded with certain three-factor interactions. Five formulation factors and two levels were selected for this study, as shown in Table 1.

Afterward, the choice of this array was appropriate since there are enough degrees of freedom to estimate with assurance, the main effects and two-factor interactions (as the three-factor interactions are not very common in practice). The L16 matrix used for the experiments is shown in Table 2. All the experiments were

Table 1. Factors selected in the study, with the nomenclature and their levels.

Factor	Alias	Level (−)	Level (+)
Amount of cholesterol (μmol)	F1	20	27
Amount of edge-activator (mg)	F2	10	12
Phase in which TM was added	F3	Ph O	Ph A
Addition of stearylamine	F4	Yes	No
Type of edge-activator	F5	Tween® 20	Deo-Na

Table 2. L16 orthogonal array used in this study.

Run	F1	F2	F3	F4	F5
1	−	−	−	−	−
2	−	−	−	+	+
3	−	−	+	−	+
4	−	−	+	+	−
5	−	+	−	−	+
6	−	+	−	+	−
7	−	+	+	−	−
8	−	+	+	+	+
9	+	−	−	−	+
10	+	−	−	+	−
11	+	−	+	−	−
12	+	−	+	+	+
13	+	+	−	−	−
14	+	+	−	+	+
15	+	+	+	−	+
16	+	+	+	+	−

(−): lower level of the factor. (+): higher level of the factor. F1: Amount of cholesterol (μmol). F2: Amount of edge-activator (mg). F3: Phase in which TM was added. F4: Addition of stearylamine. F5: Type of edge-activator.

conducted in triplicate in order to estimate the variability of the data and hence the error values.

The resultant samples were characterized in terms of DI, EPC recovery, vesicle size, PdI, zeta potential and PDE. They constituted the dependent variables of the study. ANOVA test was performed in this screening stage in order to determine which test factors (main or interaction between main parameters) were statistically significant for each response, establishing what level changes produce an effect on the response that is clearly higher to the effect introduced from the experimental error.

Finally, optimization techniques have been applied in order to obtain a predictable response as a function of the desired properties. In this field, it was desirable minimizing PdI and zeta potential, and to maximize the DI, EPC recovery, vesicle size and PDE, all of them after the extrusion process. Marginal means and regression analysis have been tested as mathematical tools in this stage. The choice of a non-linear regression model is particularly based on the choice of the design of experiments selected, being capable to determine the effects of main factors and interactions between factors. The selection of another higher order polynomial function would increase the model adjustment to the input data, but the reliability of the predictions will be reduced. The adjustment of each response was justified by adjusting R-squared coefficient.

In some cases, a logarithmic transformation of the response was required. This has been applied for vesicle size responses (before and after extrusion), since patterns were observed in terms of residuals. Once the regression functions were obtained, the individual responses were optimized, by using Mathlab software package (licensed by Universidad de Sevilla).

Finally, the robustness of the optimized formulations has been qualified from the confirmation experiments. Final formulations with the optimal conditions were repeated to verify the suitability of the optimization methodology.

In vitro *permeation studies*

In vitro permeation studies were realized using a Franz type diffusion cell apparatus. The receptor cells were water-jacketed, and the water supply of each array was connected to a thermostatically controlled water bath. Synthetic 0.2 mm cellulose nitrate membranes (47 mm diameter) were used as permeability barrier, giving a diffusion area of 3.14 cm^2. For the study, the membranes were hydrated with Hepes pH 7.4 solution for 1 h following the contacting to 0.5 mL of gelatin 0.12 mg/mL.

The receiver side of the diffusion cell was filled with 16 mL of simulated tear fluid (NaHCO3 0.218%w/w, NaCl 0.678%w/w, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0084%w/w, KCl 0.138%w/w) and stirred continuously with a magnetic stirrer. The diffusion cell was kept thermostatized at 35 °C during the experiment.

The previously hydrated cellulose membrane was mounted between the donor and receptor compartment and 1 mL of each sample was placed on the membrane surface in the donor compartment. The diffusion cell was closed and all outlets and joints were sealed using paraffin to prevent moisture loss. Aliquots (1 mL) were withdrawn from the receiver chamber at predetermined time intervals (30, 60, 120, 240, 360 and 1440 min) and an equal volume of buffer was immediately added to maintain a constant volume. Permeation was determined by measuring the amount of drug in the receiver chamber. Each experiment was conducted in triplicate.

The mean cumulative amount of drug permeated per unit surface area of the membrane was plotted versus time. The slope of the linear portion of the plot was calculated. The rate (slope of the linear portion of the plot) divided by the area available for diffusion (A) generates the permeability coefficient (P).

$$P = \frac{\frac{dQ}{dt}}{ACd}$$

A = Diffusion area (3.14 cm^2) dQ/dt = amount of drug/time
Cd = drug concentration in the donor compartment
The steady-state flux (J_{ss}) was calculated as follows:

$$J_{ss} = P \cdot C_d$$

Results

Deformability properties

In the current study, the deformability properties of flexible liposomes have been studied on the basis of two parameters: the DI and the phosphorous recovery, both of them after the extrusion mechanism. Results obtained (Table 3) evidenced an advantageous behavior in deformability characteristics in experiment 3. Certainly, the DI of 0.74 mL/min and recovery of 100% of phosphorous content (33 mg/mL of purified phosphatidylcholine) indicated that this composition was adequate for our purpose.

In order to analyze the statistical significance of the factors on the responses evaluated, these experimental data were simultaneously explained from the analysis of variance of the main factors and their interactions for each response. From the ANOVA test and after maximizing both responses, the following formulation conditions were obtained. DI was maximized as follows: 20 μmol CH, Deo-Na 10 mg, addition of TM into the aqueous phase of liposomes and to incorporate SA into the bilayer. However, for EPC recovery: 27 μmol CH, Deo-Na 15 mg, addition of TM into the

Table 3. Compiled results of the responses evaluated after the extrusion process. Results corresponding to PDE (%) before samples were extruded, have been also reported.

	Size (nm)	PdI	Zeta (mV)	PDE (%) before	PDE (%) after	EPC recovery (mg/mL)	DI (mL/min)
1	181.2 ± 3.5	0.2 ± 0.01	7.4 ± 1.2	19.1 ± 2.4	3.0 ± 0.05	30.1 ± 0.2	0.33 ± 0.013
2	159.7 ± 1.3	0.1 ± 0.01	−16.0 ± 0.5	23.1 ± 4.7	2.9 ± 0.08	24.7 ± 0.1	0.26 ± 0.004
3	271.5 ± 1.3	0.2 ± 0.01	2.4 ± 0.5	32.2 ± 0.8	10.7 ± 0.03	33.7 ± 0.5	0.74 ± 0.007
4	177.9 ± 1.7	0.2 ± 0.03	−6.8 ± 0.4	23.7 ± 8.4	3.0 ± 0.02	25.7 ± 0.09	0.32 ± 0.006
5	198.1 ± 1.0	0.3 ± 0.02	−1.4 ± 0.4	33.2 ± 5.5	9.9 ± 0.02	25.1 ± 0.1	0.39 ± 0.004
6	185.8 ± 2.0	0.2 ± 0.02	−8.1 ± 0.7	21.3 ± 1.4	3.2 ± 0.03	31.1 ± 0.3	0.35 ± 0.007
7	186.3 ± 1.9	0.2 ± 0.01	5.4 ± 0.3	19.1 ± 1.5	1.6 ± 0.01	21.5 ± 0.4	0.35 ± 0.007
8	141.2 ± 1.8	0.1 ± 0.01	−11.7 ± 0.7	35.7 ± 4.8	1.6 ± 0.04	23.2 ± 0.2	0.2 ± 0.005
9	166.6 ± 2.0	0.2 ± 0.03	−0.9 ± 0.4	29.1 ± 7.7	1.1 ± 0.01	24.7 ± 0.1	0.28 ± 0.007
10	178.1 ± 2.2	0.2 ± 0.01	−6.4 ± 0.5	39.3 ± 8.1	4.0 ± 0.02	25.4 ± 0.1	0.32 ± 0.008
11	172.8 ± 1.9	0.2 ± 0.02	5.6 ± 0.2	16.7 ± 3.4	0.9 ± 0.03	23.6 ± 0.2	0.30 ± 0.007
12	157.9 ± 1.0	0.2 ± 0.03	−13.2 ± 0.1	82.2 ± 9.2	5.5 ± 0.01	31.1 ± 0.3	0.25 ± 0.003
13	167.1 ± 1.5	0.2 ± 0.01	−13.8 ± 0.8	64.1 ± 12.1	5.2 ± 0.02	33.4 ± 0.3	0.28 ± 0.005
14	163.2 ± 4.4	0.1 ± 0.01	−15.4 ± 0.9	53.6 ± 6.2	3.1 ± 0.02	33.5 ± 0.2	0.27 ± 0.015
15	172.3 ± 0.7	0.2 ± 0.03	−0.9 ± 0.2	27.6 ± 3.3	5.9 ± 0.01	33.7 ± 0.3	0.30 ± 0.003
16	183.7 ± 2.2	0.2 ± 0.01	−5.7 ± 0.3	86.4 ± 4.0	5.6 ± 0.03	33.3 ± 0.3	0.34 ± 0.008

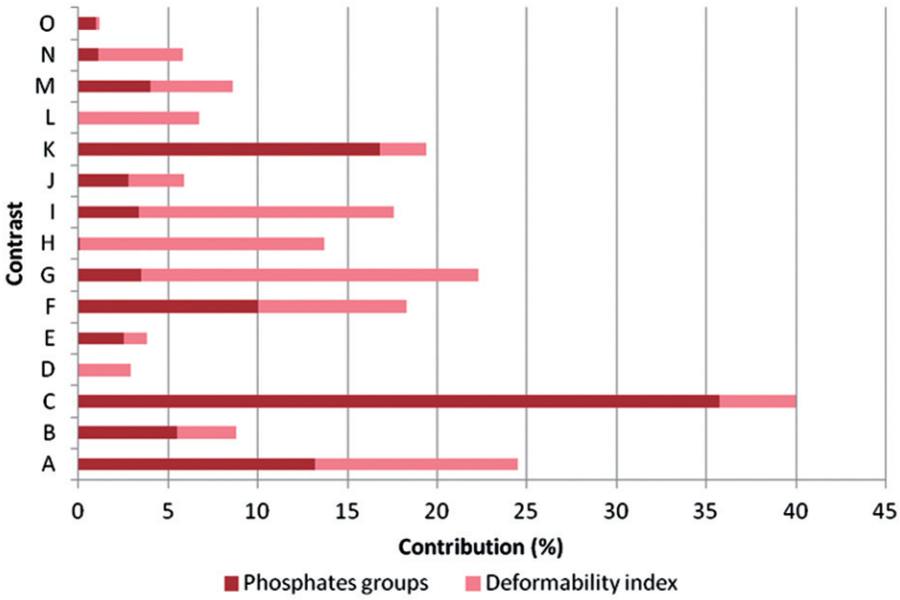


Figure 2. Contribution percentages of main factors and their two-factor interactions on phosphate groups and deformability index (DI) after the extrusion process. A: F1; B: F2; C: −F1 × F2; D: F3; E: −F1 × F4; F: −F2 × F3; G: −F4 × F5; H: F4; I: −F1 × F4; J: −F2 × F4; K: −F3 × F5; L: −F3 × F4; M: −F2 × F5; N: −F1 × F5; O: F5.

aqueous phase of liposomes and without SA into the bilayer. This inconsistency in the results can be attributable to the great influence of the interactions between factors into the whole system. Certainly, the contribution degree of all the factors (Figure 2) revealed that the two-factor interactions have a relevant effect on DI and phosphorous recovery, highlighting the importance of controlling these factors in order to optimize the formulations in terms of reaching highly deformable lipid vesicles. In this sense, C and K interactions (−F1/F2 and − F3/F5) have a great influence on phospholipid recovery, meanwhile G interaction (−F4/F5) can modify the DI response.

Compiling the screening studies realized, we can summarize as follows:

1. The achievement of the vesicle recovery (measured as EPC concentration) was improved by using the higher levels of CH and Deo-Na. However, the high contribution of interaction results between them (C) may be responsible of the modifications in the model predictions. Also, the presence of SA into the bilayer could cause a restructuration that generates the loss of EPC fraction.
2. With respect to DI, these values were higher as the lipid components were lower, as logical, because these substances contribute to stiffening the membranes. With respect to the surfactant deoxycholate, the lower level was desirable to maintain the deformability characteristics into the whole structure. It is important to note that after analyzing the effects of these formulation parameters on the vesicle size, all factors were in the same trend that DI so, a relationship between both parameters can be established: as the relative vesicle size is higher after the extrusion, the liposomal structure become more flexible and deformable after this physical mechanism.
3. CH concentration into the bilayer constitutes the most contributing factor to the deformability parameters (Figure 2), as main factor interacting with the amount added of edge-activator. Therefore, this finding must be considered in the next stages of the analysis.

From the results obtained in this screening phase, it is clearly necessary an optimization stage in order to clarify the adequate formulation that offers better deformability properties to transfersomes.

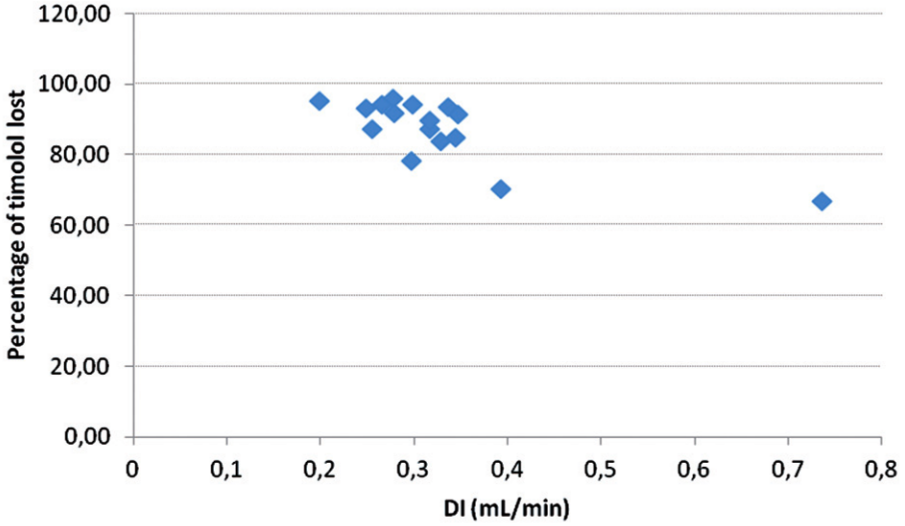


Figure 3. Relationship between the drug lost in the extrusion process (%) and the deformability index (DI).

Deformability and drug entrapment

TM entrapment percentages have been analyzed before and after vesicles were extruded. The different lipid composition of the samples resulted in many different PDE values, ranging from 16% to 86% before extruding them (Table 3). PDE was not completed (100%) in any of the formulations tested. This result may be attributed to the different composition of vesicles, producing elastic deformable structures, as advocated by some authors[25], making them more permeable and facilitating, in this manner, the leakage of liposomes and the subsequent output of the encapsulated drug before and during the centrifugation process. Certainly, ANOVA analysis supported this asseveration and increased values of PDE may be obtained by internalizing the drug into the aqueous phase, as expected. In addition, the use of deoxycholate as edge-activator at the higher level selected (12 mg), provided a negative charge into the bilayer, often leading to the repulsive forces between the lammelae, thus increasing the size of the internal aqueous compartment of the liposomes and contributing to enhance the encapsulation of the hydrophilic drug.

Afterward, a relationship between the percentage of drug lost after the extrusion process and the DI has been found. In Figure 3, a decreasing trend line of experimental points can be elucidated. Hence, the lower percentage of TM lost during the extrusion process with respect to the initial loading corresponds to the more flexible vesicles.

Optimization stage

From the ANOVA tests, the influence of five formulation factors on several deformability properties of TM-loaded transfersomes has been analyzed. There is some disparity related to the influence of some factors on the responses evaluated, such as the CH and Deo-Na amounts and the presence or not of a positively charged agent into the lipid bilayer. In addition, it is well-known the predictable effect of the first-order interactions on the responses. Therefore, two optimization methodologies have been applied in order to select the adequate formulation within our purposes: marginal means and regression analysis.

Marginal means methodology

Marginal means for one factor are defined as the mean values for a factor that is averaged across all levels of the other factors. Results obtained for DI (mL/min) and EPC recovery (mg/mL) are shown in Figure 4(A and B) respectively. This study has been realized to all variables analyzed (vesicle size, PdI, zeta potential and PDE), but only those diagrams corresponding to deformability parameters have been reported here.

From these Figures, the optimal combination of these factors can be extracted maximizing both responses, in order to obtain the predicted values for them. Also, this procedure has been applied to the other responses evaluated, and results have been collected in the Table 4. For each response, a confirmatory experiment was performed, based on which the prediction error was calculated.

The predicted values by the marginal means methodology were obtained as the average of the maximum response for each level. In the case of DI and phosphorous recovery:

$$\max DI = \frac{0.3656 + 0.3481 + 0.3469 + 0.370 + 0.3344}{5} = 0.3530\,\mathrm{mL/min}$$

$$\max phosphorous = \frac{29.86 + 29.30 + 28.33 + 28.42 + 28.7}{5} = 28.92\,\mathrm{mg}$$

As revealed this table, the prediction error for all responses ranged from 1.68% to 53.39% and only three of the six responses had a predicted error below 10% (PdI, vesicle size and EPC recovery) while the other variables show an error higher than 10%. Based on these results, we can conclude that, although this method is easy to apply, a major error may be involved when optimizing, when the effect of interactions was considered, as was previously visualized from the ANOVA results. For example, in the case of PDE variable, for which a high prediction error was obtained (53.39%), the contribution of main factors to this response was low, being the maximum contribution 10% for the type of edge-activator. However, two-factor interactions contributed in a higher percentage (>20%). This can explain the high variability in predicting this variable.

As a conclusion, the use of another complementary technique may be appropriate to clarify the contribution degree of interactions, in the case of predicting the interactions.

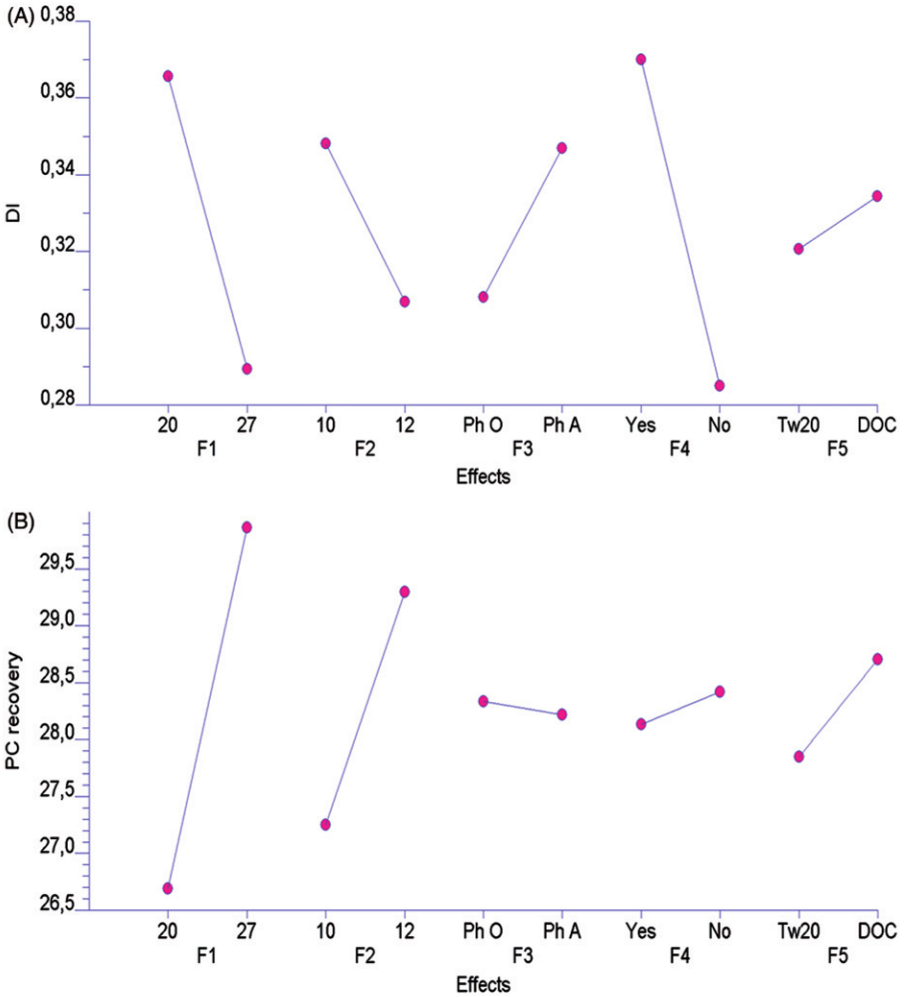


Figure 4. Diagrams of marginal means corresponding to (A) deformability index (DI) and (B) phosphatidylcholine recovery.

Table 4. Optimized parameters by marginal means and regression analysis.

Response	Optimized levels F1/F2/F3/F4/F5	Averaged predicted value	Confirmatory experiment	Prediction error (%)
Marginal means				
DI	−1/−1/1/−1/1	0.353	0.425	16.94
EPC recovery	1/1/1/1/1	28.92	31.15	7.16
Size	−1/−1/1/−1/−1	184.84	188.0	1.68
PdI	−1/1/1/1/1	0.183	0.2	8.5
Zeta	1/1/−1/1/1	7.56	13.66	44.66
PDE	−1/1/1/−1/1	4.60	9.87	53.39
Regression analysis				
DI	−1/−1/1/−1/1	0.735	0.740	0.0676
EPC recovery	1/1/−1/1/−1	38.534	35.13	9.7
Size	−1/1/1/1/1	141.15	141.2	0.03
PdI	−1/1/1/1/1	0.113	0.1	1.30
Zeta	−1/−1/−1/1/1	16.75	15.8	5.95
PDE	−1/−1/1/−1/1	10.653	10.7	0.047

Regression analysis

The use of this optimization methodology enables to analyze the influence of the main factors and their interactions on the response evaluated.

From the regression equations and model adjustment parameters (Table 5), the optimized parameters and predicted responses were obtained, whose data are shown in Table 4.

Similarly, a confirmatory experiment was performed for each response, based on which the prediction error was calculated.

In contrast to the previous model, low prediction errors may be observed in this case, which were estimated based on the R^2_{adj} values, ranging from 0.03% to 9.7%. The largest errors were obtained from zeta potential PdI and EPC recovery in which the prediction errors were higher than those resulted from marginal means. The complexity of the interactions, which are more sensitive to be considered in the regression methodology, could contribute to the obtainment of reduced variability. So, the regression analysis provides an adequate optimizing technique with lower prediction error.

In vitro *permeation studies*

The purpose of this study was to demonstrate that the optimized transfersome formulation showed a different permeation behavior

Table 5. Regression equations and adjustment parameters for the dependent variables evaluated.

	Equations	*MSE*	R^2_{adj}
	$DI = 0.328 - 0.0381Ch - 0.0206AEA + 0.0194Dr - 0.0425EA + 0.00687TE + 0.0238Ch \cdot AEA - 0.0137Ch \cdot Dr - 0.0325AEA \cdot Dr + 0.0431Ch \cdot EA + 0.0206AEA \cdot EA - 0.0294Dr \cdot EA - 0.025Ch \cdot TE - 0.0238AEA \cdot TE + 0.0188Dr \cdot TE - 0.049AEA \cdot TE$	0.0004	0.9981
	$P = 28.3 + 1.59Ch + 1.02AEA - 0.0571Dr + 0.143EA + 0.428TE + 2.61Ch \cdot AEA + 0.696Ch \cdot Dr - 1.38AEA \cdot Dr + 0.811Ch \cdot EA + 0.735AEA \cdot EA + 0.449Ch \cdot TE - 0.871AEA \cdot TE + 1.79Dr \cdot TE - 0.82EA \cdot TE$	0.548	0.9916
After	$\widehat{VS}_{log} = 2.25 - 0.0179F1 - 0.00826F2 + 0.00655F3 - 0.0237F4 - 0.00438F5 + 0.0117F1 \cdot F2 - 0.00301F1 \cdot F3 - 0.0167F2 \cdot F3 + 0.0246F3 \cdot F4 + 0.00735F2 \cdot F4 - 0.0157F3 \cdot F4 - 0.00889F1 \cdot F5 - 0.0119F2 \cdot F5 + 0.0039F3 \cdot F5 - 0.0294F4 \cdot F5$ $\widehat{VS} = 10^{\widehat{VS}_{log}}$	2.784e-5	0.9921
	$\widehat{PDI} = 0.189 - 0.00552F1 - 0.0039F2 - 0.00102F3 - 0.0214F4 + 0.00281F5 + 0.0111F1 \cdot F3 - 0.0094F2 \cdot F3 + 0.0094F1 \cdot F4 + 0.00598F1 \cdot F5 - 0.0223F4 \cdot F5$	0.0003	0.7968
	$\widehat{ZP} = 7.38 + 0.332F1 + 2.12F2 - 0.943F3 + 0.33F4 - 5.65F5 + 3.97F1 \cdot F2 - 1.15F1 \cdot F3 - 3.09F2 \cdot F3 - 1.58F1 \cdot F4 - 1.66F2 \cdot F4 - 1.23F1 \cdot F4 - 2.48F2 \cdot F4 + 1.7F3 \cdot F5 + 13.9F4 \cdot F5$	0.3896	0.9844
	$\widehat{PDE} = 4.21 - 0.279F1 + 0.311F2 + 0.152F3 - 0.595F4 + 0.878F5 + 0.726F1 \cdot F2 + 0.417F1 \cdot F3 - 0.973F2 \cdot F3 + 1.21F1 \cdot F4 - 0.543F2 \cdot F4 + 0.169F3 \cdot F4 - 0.898F1 \cdot F5 - 0.269F2 \cdot F5 + 0.682F3 \cdot F5 - 1.22F4 \cdot F5$	0.001	0.999

F1: Amount of cholesterol (μmol). F2: Amount of edge-activator (mg). F3: Phase in which TM was added. F4: Addition of stearylamine. F5: Type of edge-activator.

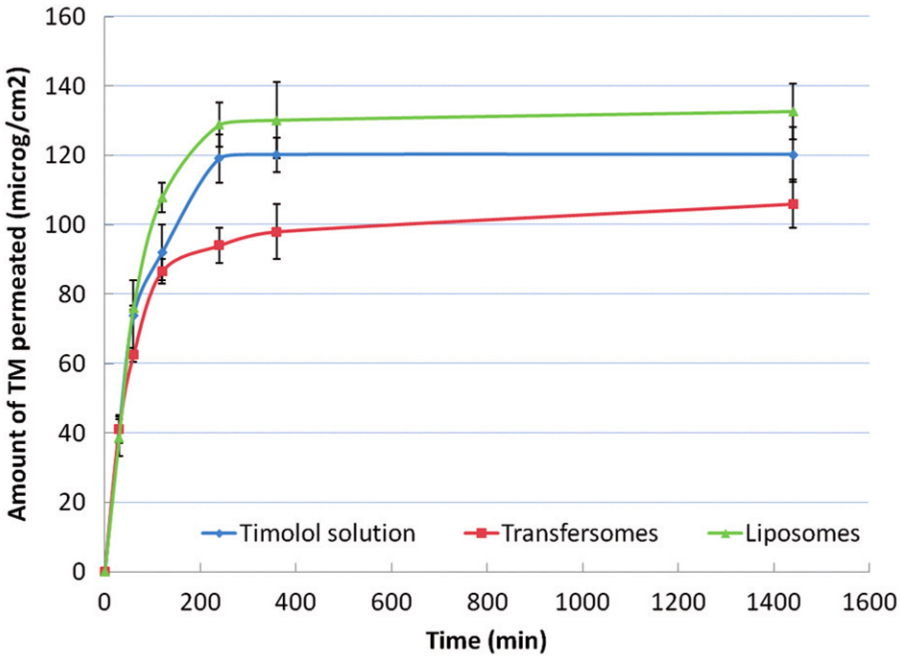


Figure 5. Permeation of timolol through artificial membranes from various preparations (means ± SD, n = 3).

with respect to conventional liposomes and standard solutions of timolol.

The *in vitro* permeation profiles obtained (Figure 5) revealed that the influence of bilayer composition was evident (Deo-Na). Analyzing the first 2 h, the amount of drug permeated was linear in all formulations, attributable to a burst effect of the free drug in the formulations. After this time, a different behavior among the samples was evident. The percentage and rate of drug permeated from liposomes and standard solution was similar, proving that drug release from liposomes was produced before dissolved timolol was permeated though the membrane (Jss: 0.2361 and 0.2822 $\mu g \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$, respectively). However, the bilayer

composition of transfersomes allows the sustained release of timolol as a consequence of drug release once the vesicle has passed through the membrane (Jss: 0.1477 $\mu g \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$). Here, we have demonstrated that the lipid to surfactant ratio and type of surfactant are the main key factor for determining the flexibility of the bilayer of transfersomes.

Discussion

The potential of flexible vesicles aimed for ophthalmic drug delivery is focused on their ability to pass intact the corneal membrane[26], taking into account that the basement membrane has a complex topography consisting of tightly cross-linked fibers intermingled with pores with diameters lower than 200 nm[26]. Therefore, it is crucial to know the deformability properties of these modified vesicles in order to modulate the diffusion across this membrane.

An interesting classification of the non-invasive vesicular carriers has been reported by Cevc, where the deformability capacity of lipid bilayer was emphasized[11]. Transfersomes were considered as the first or second generation, in which the deformability takes place via reversible by demixing of two or more amphipathic components comprising the carrier bilayer: the primary component (phospholipid), bilayer building, and the secondary, bilayer softening, that is surfactant (such as Deo-Na or a non-ionic surfactant). This composition provides high bilayer flexibility and permeability via lateral redistribution or insertion/expulsion of differently polar amphipathic substances. The contribution of second generation carriers consists on the addition of at least two more polar lipophilic substances, creating a synergistic bilayer softening that increased vesicle membrane adaptability. Finally, as our study, the third generation of ultradeformable drug carriers exploits the adaptive redistribution of hydrophilic additives near a bilayer. A well-chosen water-soluble substance combined with a bilayer destabilizing substance can thus modulate the bilayer vesicle deformability.

Taking into account these previous considerations, it is important to highlight the relevance of the bilayer composition and distribution of components over the deforming ability of these ultradeformable vesicles. First of all, EPC was purified in order to maintain 0.068 mmol, in a constant molar ratio to the edge-activator, approximately 80:20 w/w, according to Essa et al.[27]. The incorporation of CH in lower concentrations than conventional liposomes promotes the deformability of vesicles.

Previous studies have revealed that the addition of SA in the formulation facilitates the contact of vesicles with the biological membranes. On the other hand, the presence of surface charge enables the electrostatic repulsion among them, increasing the stability of this colloidal dispersion, as reported González-Rodríguez and Rabasco[28]. Also, vesicles incorporating SA and ionized drugs had a PDE higher than other without this charged compound. This has been demonstrated for drugs such as sumatriptan succinate and lidocaine hydrochloride[29,30].

In the current study, the extrusion mechanism has been introduced as a rapid and convenient method to study the deformability behavior of TM-loaded transfersomes. As was reported in the literature, under moderate pressures, the liquid crystalline MLV dispersion can be forced through filters with defined pore sizes. As the concentric layers of the multilamellar liposome are deformed when crossing through the pore, a breaking and resealing of the membranes occurs. If a liposome preparation is repeatedly cycled through a filter, this process gives rise to a liposome population with a mean diameter that reflects that of the used filter. As the liposome diameter approaches that of the filter pore, less membrane deformation must occur to allow passage through the filter. After five passes, the majority of liposomes pass-through the filter without any change in their final diameter[31].

In order to clarify the vesicle behavior with respect to deformability properties, an *in vitro* simulating method has been applied as has been reported by other authors[12,13]. In this case, our contribution was focused to analyze mainly two parameters related to the deformability characteristics after the extrusion process: the DI and the EPC recovery. Other parameters have been also studied to justify the whole behavior of this approach: vesicle size, surface charge and percentage of TM entrapped into the vesicles.

With respect to the deformability capacity, ANOM analysis showed that increasing the cholesterol concentration, a decrease in DI values were obtained.

Cholesterol plays an important role in regulating the properties of phospholipid membranes. The incorporation of this lipid has been widely reported to increase membrane stability, decrease permeability and increase encapsulation of hydrophilic drugs[32]. The rigid sterol of cholesterol must be accommodated by the fluctuating lipid chains thereby reducing lipid chain entropy in saturated phospholipids above the phase T_c, as was demonstrated for egg lecithin[33]. However, the stabilizing effect of cholesterol on the lipid bilayer is diverse due to differences in its interaction with phospholipid molecules and its capability to fill voids within the liposomal membrane to give effectively an adequate package that improves bilayer stability. This claim was in accordance to the optimized parameters in terms of zeta potential and PdI values, where lower values were obtained with higher cholesterol amounts.

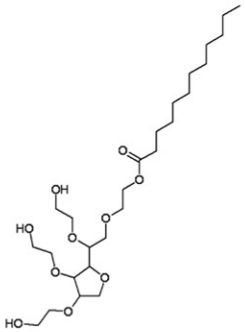
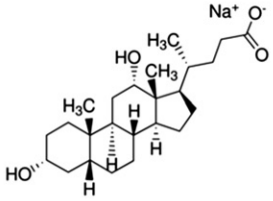
This packing capability of cholesterol on the lipid membrane has a straight consequence on the vesicle size and an opposite relationship between size and cholesterol concentration was achieved, as was consolidated in the literature[34]. However, the extrusion is expected to induce high curvature in the extruded liposomes which in turn would distort the packing of the acyl chains and increase the energy state of the lipid molecules. Consequently, the rigid structure of cholesterol contributes to difficult the extrusion process, supported by the smaller size for the extruded liposomes compared to the non-extruded liposomes[35].

These data are clearly consistent with previous studies, where the incorporation of cholesterol in concentrations higher than 30% leads to a higher degree of packing the phospholipid molecules, thereby diminishing the movement freedom and increasing the rigidity of the membrane[36]. Presumably, this phenomenon was related to changes in the phase transition properties of the constituent phospholipids. However, also lower levels of the edge-activator will be selected in order to obtain more flexible vesicles. This behavior could be explained because both CH and Deo-Na have a similar hydrophobic steroidal molecular structure and compete for the same sites in the liposome membrane. CH is more lipophilic (log P$\sim$7.17) than Deo-Na (log P$\sim$3.50) and therefore should be preferentially incorporated/partitioned in the liposome membranes, leading to a displacement of Deo-Na molecules and a decrease in the deformability properties. Similar behavior has been found in dexametasone-loaded liposomes[35].

This relationship between both components of the bilayer can be visualized when analyzing the phosphorous recovery after the extrusion mechanism. Although the use of higher levels of CH and Deo-Na as main factors in the formulations is recommended, however, the interaction between both factors (interaction C) is significant in the statistical design, revealing the competence between these main factors and the relevance of this study.

The combination of a strong deformability of vesicle together to a transepidermal gradient is thus essential for achieving

Table 6. Structural and physicochemical characteristics of Tween® 20 and sodium deoxycholate (Deo-Na). Molecular structure of Tween® 20 (wikipedia.org) and Deo-Na (www.sigmaaldrich.com).

	Tween® 20	Deo-Na
Chemical structure		
Molecular weight	1227.54	430.55
Surfactant type	Non ionic	Anionic
HLB	16.7	16
CMC	60 mg/L	3.870 mg/L
Water solubility	100 g/L	150 g/L

spontaneous vesicle transport through the corneal membrane. In this work, two different edge-activator surfactants were used (Tween® 20 and Deo-Na) with the aim to enhance the deformability properties and to contribute to this gradient. The elasticity of vesicles also depends on the type of surfactant. Deo-Na formulations showed higher DI values than Tween® 20 formulations. High membrane elasticity has been suggested being crucial for pushing a vesicle through a pore smaller than the average aggregate diameter. This is argued to be of paramount importance for the success of the non-invasive, carrier-mediated material transport across the biological membranes. In spite of having higher molecular weight (Table 6), polyoxyethylenesorbitan monolaurate is less bulky and is non-ionized, which contributes to improve the packing capability into the bilayer and lower vesicle sizes. However, when the ultradeformable liposomes are submitted to a local stress of deformation, the individual components, initially homogeneously mixed, are partly separated in the bilayer. In this case, the most soluble ingredient (Deo-Na) is accumulated within the sites of highest curvature, causing the increase in the vesicle size[37]. In addition, both surfactants have similar HLB (16 aprox.), but their CMC was very different. Moreover, this demixing and restructuration of bilayer components was verified considering the PdI values, because the same relationship was maintained: the homogeneity of samples was higher in Deo-Na samples after the deformation process. Again, the molecular volume and the ionization of surfactant have influence on this parameter. In addition, further decreasing in the elasticity of the vesicles by using the same concentration of surfactants may mainly due to mixed micelles formation when concentration of the surfactant is higher than the CMC, as was observed with Tween® 20 (CMC 60 mg/L) and Deo-Na (CMC 3.870 mg/L).

Commonly, liposome formulations are characterized by a trend to accumulate the hydrophilic drug (TM) into the aqueous compartment, offering the vesicles a lipophilic environment that facilitates the passage through the corneal membrane.

Analyzing PDE results, a high stabilizing effect has been denoted with Deo-Na in the lipid composition. Surfactant molecules might intercalate into the bilayer, altering the packing of the bilayer and the permeability of the entrapped compounds through the vesicles. Based on these HLB values (aprox. 16) and the ionization of Deo-Na, we can explain the entrapment of TM into the vesicles after the extrusion process. TM is a water-soluble compound that contributes increasing the amount of drug encapsulated into the vesicles, as observed in this study and as was reported by other authors[29]. In addition, the ionization characteristics of this drug (pK_a 9.21) could affect the lipid bilayer structure, as was demonstrated by other authors with terbinafine[11]. According to this study, TM was mainly protonated at pH 7.4 ($pH < pK_a$). At this pH, the drug is bound to the bilayer, suggesting poor bilayer softening efficiency, which can even stiffen lipid membranes and removal the drug content during the extrusion process. Therefore, the reduction in the bilayer deformability requires more time to form new vesicles after extrusion process, giving rise to the lost of entrapped TM.

In addition, as was previously discussed, after the extrusion, Deo-Na vesicles had higher size dimensions than Tween® 20 formulations. This result, in addition with the unilamellarity of extruded vesicles, contributes to the enhancement of the entrapped drug in this type of liposomes[12].

The presence of SA in the vesicle composition has a crucial importance on PDE. Before extruding the samples, some bilayer components, such as CH in its higher level (27 μmol) and SA (5 mg) contributed to the improvement of the PDE, as has been previously discussed in the literature[30]. SA is located into the lipid bilayer and its presence contributed also to increase the entrapment efficiency. This occurs because SA may affect specific characteristics such as the membrane permeability or the electric charge density, as was postulated by Kotynska and Figaszewski[38]. The influence over the size can be justified by the possible asymmetrical distribution of SA in the bilayer, giving rise to higher vesicles in size, as was demonstrated by Villasmil et al.[39].

From the contribution percentages of these factors on PDE, it is possible to observe that after the extrusion process, the change in level of CH and the presence of SA, as main factors, ceases to have a great significant influence of the PDE (1% and 4.7%, respectively). However, the interactions between them was important (19.3%), before and after samples were extruded, being indicative of a synergistic effect on the drug entrapment capacity.

The optimum formulation of transfersomes was picked out with the aim to attain the maximum DI, EPC recovery, vesicle size and entrapment efficiency after the extrusion. It was found that the best fitted model was quadratic with interactions and the comparative values of R-square and MSD are shown in Table 5 along with the regression equation generated for each response. The optimized transfersomes formulations were prepared. Based on the prediction, different formulations were made and the responses were determined. The checkpoint composition of vesicles along with their predicted and experimental values for all the response variables and the percentage error predicted are summarized in Table 5. The percentage prediction error assures the validity of generated equations and thus shows the applicability of regression model. The R-squared value for responses (> 0.991) showed an excellent goodness of fit at $p < 0.001$. Hence, low magnitude of error as well as the significant values of R-squared in the present investigation proves the high predictive ability of the model as exception of the phosphorous recovery, where the Marginal Means methodology demonstrates a high prediction in the response.

The *in vitro* permeation assay realized to this optimized formulation demonstrated the advantage of elastic liposomes versus conventional liposomes in terms of sustained release of timolol after vesicles passed through the permeation membrane. An electrostatic attraction force between positively charged liposomes and negatively charged membrane can occur; so, we speculate that liposomes would adsorb to the corneal surface and transfer their

membrane-associated drug directly to the corneal epithelial cell membrane. Transfersomes could cross corneal epithelial due to its content in border activator substances that give them ultramembrane deformability, thereby facilitating drug passage across the cornea[40].

Conclusions

A novel deformable vesicular system (transfersomes) for ophthalmic drug delivery of TM was formulated and optimized. After studying the deformability properties (DI and phosphorous groups) and applying two different optimization approaches (Marginal Means and Regression), the optimized formulation of TM was composed of TM 0.5 mg/mL, EPC 68 μmol, CH 20 μmol, Deo-Na 23.2 μmol, SA 18.56 μmol and adding the drug into the aqueous compartment of liposomes. Overall EPC content in the optimized formulation was 100%, which assures that the lipid mixture used in the preparation could actually form the vesicles after the extrusion. Interestingly, we have found that the lipid to surfactant ratio and type of surfactant are the main key factor for determining the flexibility of the bilayer of transfersomes.

However, alternative statistical tools, such as neuronal networks will be applied in future works, in order to minimize the error predictions in the research.

Disclosure statement

The authors report no declarations of interest.

References

1. Gan L, Wang J, Jiang M, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov Today 2013;18:290–7.
2. Hao J, Wang X, Bi Y, et al. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. Colloids Surf B Biointerfaces 2014;114:111–20.
3. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug Discov Today 2008;13:144–51.
4. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. Int J Pharm 2007;332:1–16.
5. Cevc G. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. In: Lipowsky R, ed. Handbook of physics of biological systems. Vol. I. Amsterdam: Elsevier; 1995:441–66.
6. Schätzlein A, Cevc G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). Br J Dermatol 1998;1368:201–15.
7. Di Marzio L, Marianecci C, Rinaldi F, et al. Deformable surfactant vesicles loading ammonium glycyrrhizinate: characterization and in vitro permeation studies. Lett Drug Des Discov 2012;9:494–9.
8. Gupta A, Aggarwal G, Singla S, Arora R. Transfersomes: a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery of sertraline: Development, characterization and performance evaluation. Sci Pharm 2012;80:1061–80.
9. Lei W, Yu C, Lin H, Zhou X. Development of tacrolimus-loaded transfersomes for deeper skin penetration enhancement and therapeutic effect improvement in vivo. Asian J Pharm Sci 2013;8:333–45.
10. Gillet A, Grammenosb A, Compèrec P, et al. Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. Int J Pharm 2009;380:174–80.
11. Cevc G. Rational design of new product candidates: the next generation of highly deformable bilayer vesicles for noninvasive, targeted therapy. J Control Release 2012;160:135–46.
12. Liu D, Hu H, Lin Z, et al. Quercetin deformable liposome: preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. J Photochem Photobiol B Biol 2013;127:8–17.
13. Carrer DC, Higa LH, Defain MV, et al. Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. Colloids Surf B Biointerfaces 2014;121:281–9.
14. Oh E, Jin SE, Kim JK, et al. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. Eur J Pharm Sci 2011;44:149–57.
15. Shen Y, Tu J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. AAPS J 2007;9:371–7.
16. Volotinen M, Mäenpää J, Kautiainen H, et al. Ophthalmic timolol in a hydrogel vehicle leads to minor inter individual variation in timolol concentration in aqueous humor. Eur J Pharm Sci 2009;36:292–6.
17. Yu S, Wang QM, Wang X, et al. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for opthalmic delivery of timolol maleate. Int J Pharm 2015;480:128–36.
18. Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. Int J Pharm 2005;290:155–9.
19. Siafakaa PI, Titopouloua A, Koukarasb EN, et al. Chitosan derivatives as effective nanocarriers for ocular release of timolol drug. Int J Pharm 2015;495:249–64.
20. González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, et al. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. J Pharm Sci 2012;101:3845–63.
21. Al-Hanbali O, Onwuzo NM, Rutt KJ, et al. Modification of the Stewart biphasic colorimetric assay for stable and accurate quantitative determination of Pluronic and Tetronic block copolymers for application in biological systems. Anal Biochem 2006;361:287–93.
22. Zuidam NJ, Vrueh R, Crommelin DJA. Characterization of liposomes. In: Torchilin VP, Weissig V, eds. Liposomes. 2nd edn. Oxford: Oxford University Press; 2007:31–78.
23. Chimanuka B, Gabriels M, Detaevernier M, Plazier-Vercemmen J. Preparation of beta-artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. J Pharm Biomed Anal 2002;28:13–22.
24. Fang Y, Tsai Y, Wu P, Huang Y. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. Int J Pharm 2008;356: 144–52.
25. Lasic DD. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol 1998;16:307–21.
26. Abrams GA, Goodman SL, Nealey SF, et al. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. Cell Tissue Res 2000;299: 39–46.
27. Essa EA, Bonner MC, Barry BW. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. J Control Release 2004;95:535–46.

28. González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. Expert Opin Drug Deliv 2011;8:1–15.
29. González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, et al. Application of statistical design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. Int J Pharm 2007;337:336–45.
30. Villasmil S, Dhrimeur W, Salas S, et al. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. Drug Dev Ind Pharm 2010;36:666–75.
31. Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, et al. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. J Med Biol Engineer 2007;27:29–34.
32. Demetzos C. Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. J Liposome Res 2008;18:159–73.
33. Liu D, Chen W, Tasi L, Yang S. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp 2000;172:57–67.
34. López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int J Pharm 2005;298:1–12.
35. Bhardwaj U, Burgess DJ. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. Int J Pharm 2010;388: 181–9.
36. Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, et al. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. J Control Release 2000;68:85–95.
37. Hofer C, Hartung R, Gobel R, et al. New ultradeformable drug carriers for potential transdermal application of interleukin-2 and interferon-alpha: theoretic and practical aspects. World J Surg 2000;24:1187–9.
38. Kotynska J, Figaszewski ZA. Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine-stearylamine liposome membrane. Biophys Chem 2007;127: 84–90.
39. Villasmil S, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Thermal and ^{31}P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in Phosphatidylcholine/Cholesterol liposomes. Comparative ^{31}P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. Coll Surf B Biointerfaces 2013;105:14–23.
40. Hosny KM. Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin. AAPS Pharm Sci Tech 2009;10:1336–42.

Titolo rivista/libro: Drug development and industrial pharmacy (Online)

Titolo articolo/sezione: Artificial neural networks as alternative tool for minimizing error predictions in manufacturing ultradeformable nanoliposome formulations

Autore/i: José M. León Blanco

ISSN: 1520-5762

DOI:

Anno: 2017

Volume:

Fascicolo:

Editore:

Pag. iniziale: 1

Pag. finale: 9

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Drug Development and Industrial Pharmacy

ISSN: 0363-9045 (Print) 1520-5762 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iddi20

Artificial neural networks as alternative tool for minimizing error predictions in manufacturing ultradeformable nanoliposome formulations

José M. León Blanco, Pedro L. González-R, Carmen Martina Arroyo García, María José Cózar-Bernal, Marcos Calle Suárez, David Canca Ortiz, Antonio María Rabasco Álvarez & María Luisa González Rodríguez

To cite this article: José M. León Blanco, Pedro L. González-R, Carmen Martina Arroyo García, María José Cózar-Bernal, Marcos Calle Suárez, David Canca Ortiz, Antonio María Rabasco Álvarez & María Luisa González Rodríguez (2017): Artificial neural networks as alternative tool for minimizing error predictions in manufacturing ultradeformable nanoliposome formulations, Drug Development and Industrial Pharmacy, DOI: 10.1080/03639045.2017.1386201

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1386201

Accepted author version posted online: 02 Oct 2017.
Published online: 17 Oct 2017.

DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, 2017
https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1386201

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

Artificial neural networks as alternative tool for minimizing error predictions in manufacturing ultradeformable nanoliposome formulations

José M. León Blanco[a], Pedro L. González-R[a], Carmen Martina Arroyo García[b], María José Cózar-Bernal[b], Marcos Calle Suárez[a], David Canca Ortiz[a], Antonio María Rabasco Álvarez[b] and María Luisa González Rodríguez[b]

[a]Department of Industrial Management Science, School of Engineering, Universidad de Sevilla, Seville, Spain; [b]Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ABSTRACT

This work was aimed at determining the feasibility of artificial neural networks (ANN) by implementing backpropagation algorithms with default settings to generate better predictive models than multiple linear regression (MLR) analysis. The study was hypothesized on timolol-loaded liposomes. As tutorial data for ANN, causal factors were used, which were fed into the computer program. The number of training cycles has been identified in order to optimize the performance of the ANN. The optimization was performed by minimizing the error between the predicted and real response values in the training step. The results showed that training was stopped at 10 000 training cycles with 80% of the pattern values, because at this point the ANN generalizes better. Minimum validation error was achieved at 12 hidden neurons in a single layer. MLR has great prediction ability, with errors between predicted and real values lower than 1% in some of the parameters evaluated. Thus, the performance of this model was compared to that of the MLR using a factorial design. Optimal formulations were identified by minimizing the distance among measured and theoretical parameters, by estimating the prediction errors. Results indicate that the ANN shows much better predictive ability than the MLR model. These findings demonstrate the increased efficiency of the combination of ANN and design of experiments, compared to the conventional MLR modeling techniques.

ARTICLE HISTORY
Received 29 May 2017
Revised 9 August 2017
Accepted 22 September 2017

KEYWORDS
Computational modeling; liposomes; pharmaceutical manufacturing; artificial neural network; optimization; design of experiment; multiple linear regression

Introduction

The preparation of nanoparticulate drug delivery systems involves handling and optimizing a large number of factors. Conventional trial and error methods require important volumes of experiments in order to identify an acceptable solution. As the number of factors increases, these types of methods become highly inefficient. In this sense, experimental design methodologies, such as factorial design and response surface methodology, among others, have been widely used to reduce the number of experimental trials and the time-consuming, whereas relevant information, statistically checked, is obtained [1,2]. However, these methods suffer from inadequacy in their ability to predict the response outputs for new values of input variables. Usually, multiple linear regression (MLR) analysis is applied for predicting the response variables when the theoretical relationship between response variables and causal factors are not clear. For this, a second-order polynomial equation is used but, unfortunately, this approach is often limited to low degrees, resulting in poor estimation of optimal formulations [3].

In order to overcome the shortcomings of MLR, artificial neural networks (ANNs) are highly applicable when a functional dependence between the input variables (causal factors) and output results (response variables) is unknown. Thus, they are used for solving complex problems and for performing optimization approaches. Contrasting to the most commonly statistical models used, the relationship between independent and dependent variables in an ANN model can be generated without considering a specific mathematical function.

As Gaffari et al. [4] defined, 'ANN is a learning system based on a computational technique that can simulate the neurological processing ability of the human brain.'

The interest in the use of ANN for modeling the pharmaceutical formulations and processes has increased [5–9]. Nemati et al. [10] developed ANN algorithms to predict bilaterally the release profile of the drug from a set of formulation parameters or determine the input levels of these parameters to obtain a desired release profile of the drug. Interesting modified neural networks, wavelet transform-artificial neural network (WT-ANN) were reported by Wu et al. [11] in order to control the preparation process of metformin hydrochloride tablets. The correlation coefficients between the experimental values and the predicted values by ANN for granulated pellet-containing tablets and traditional pellet-containing tablets indicated the excellent prediction of ANNs [12].

In the current study, we have focused much of our attention on modeling the physicochemical characteristics and drug entrapment behavior from ultradeformable liposomes. In a previous work, we reported the use of conventional linear modeling techniques to optimize timolol-loaded transfersomes for ophthalmic drug delivery [13]. The main disadvantage we found when the marginal means techniques were used consisted of the inability to estimate interactions. Regarding the multiple regression technique, the main drawback of this methodology was the selection of the

CONTACT María Luisa González-Rodríguez malugoro@us.es Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González, 2, 41012 Seville, Spain

appropriate equation to use in the predictive model, being a usual source of errors in the optimization phase.

ANNs are interesting modeling techniques for use in drug delivery since no previous knowledge of the process mechanism is needed. Only the input/output data will be used first to train the neurons and later to validate and test the resulting model [14].

The main objective of this work was to emphasize the advantages of using ANNs to highlight the effect of factors involved in ultradeformable liposome formulations. This objective will be reached firstly, by modeling an ANN with those factors as inputs and their effects in formulations as outputs. And secondly, the effectiveness of ANNs with respect to regression and marginal means methodologies, already analyzed, will be shown.

ANNs theoretical section

ANNs concept

ANNs are computing systems designed to simulate the behavior of biological neural networks. They were conceived to simulate some of the features of the brain that outperforms a computer such as recognizing objects or faces, with flexibility to deal with incomplete or fuzzy information. As in biological nervous system, ANNs are composed of neurons that connect via nerve fibers or dendrites to other neurons. As biologically occurs, the links between the ends of dendrites of two neurons are called synapses, and when a neuron receives enough stimulus via input synapses, activates itself and emits a signal through its axon that could activate other neurons.

The intelligence of the ANN is not a new concept. The learning ability of neural networks was proposed by Morris and Hebb [15]. The first model of an artificial neuron (Figure 1) was attributed to McCulloch and Pitts [16]. In this model, the arriving signals (inputs) $x_{1t\text{-}1}$, $x_{2t\text{-}1}$, $x_{Nt\text{-}1}$ may be the outputs from other neurons (they are named t-1). Each input signal is multiplied by a factor w_{ji} (the connection weight). The weights w_{ji} simulate the strength of the connections or synapses between neurons and they can be positive or negative. The sum of the weighted inputs: $u_{it} = \sum_j^N w_{ji} x_{jt-1}$ is then passed through an activation (transfer or propagation) function: $y_{it} = \Theta(u_{it})$ to produce the output y_{it} for that neuron. In this model, the neuron i only produces an output y_{it}: the neuron is activated when the sum of the weighted inputs u_{it} is greater than a given threshold value.

The activation function proposed by McCulloch and Pitts [16] was a Heaviside step function as follows:

$$\Theta(u) = \begin{cases} 1 & \text{if } u \geq 0 \\ 0 & \text{if } u < 0 \end{cases}$$

Nowadays, several different activation functions are used (Figure 2), usually modifying the output values from {0, 1} to {−1, 1}.

ANN architecture

The way by which neurons are connected among them has a significant impact on the performance of the ANN. Basically there are three types of networks: layered networks, recurrent networks and laterally connected networks.

a. Layered networks. In this case, the network comprises an input and an output layer of processing units or neurons interconnected via one or more 'hidden' layers (Figure 3). The number of neurons in the input and output layers is determined by the number of independent and dependent variables, respectively. Neurons from a layer only receive signals from neurons in the previous layer.
These networks are also known as feedforward networks, perceptron or multilayer perceptron network (MPN). The first perceptron was proposed by Rosenblatt [17] which had only one input layer and one output layer. The MPN overcomes the limitation of the single-layer perceptron by the addition of one or more hidden layers.
b. Recurrent networks are networks in which every neuron can be connected to each other, even to itself. The best known network of this type is the Hopfield [18] network (Figure 4).
c. In Laterally connected networks, neurons are distributed in one- or two-dimensional structure. The best known network of this type was designed by Kohonen [19], as shown in Figure 5.

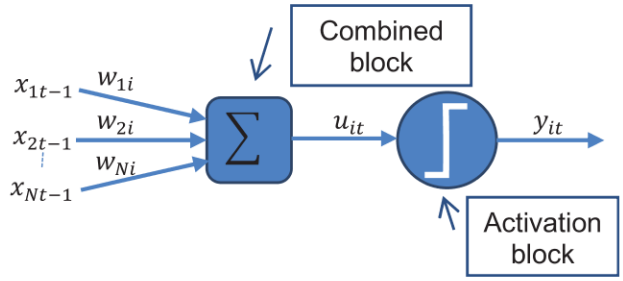


Figure 1. McCulloch–Pitts neuron model.

Learning schema

A neural network is trained for recording a set of input data by iterative adjustment of the weights. This step becomes critical in order to identify the capabilities of the ANN. The mechanism consists on feeding forward the information from inputs through the network for optimizing the weights between neurons. This optimization process resulted from the backward propagation of the error during the training or learning phase [14].

There are two learning approaches: supervised and unsupervised by a teacher, who knows the responses.

a. Supervised learning. A pattern is a set of input and output vectors. In the field of pharmaceutical design, the inputs may be the formulation parameters and the outputs are the responses obtained using those variables. When an input vector is presented to the network, its output is compared with the output vector of the pattern, usually via the Hamming distance [20]. After a number of patterns have been presented to the network, the remaining known patterns can be used to test the error of the network. Then, when an unknown pattern is presented to the network, it can infer the output to the input vector. Typically, layered networks use this type of learning.
b. Unsupervised learning. In this case, the objective is not known earlier. The network adapts its weights in order to find the relationships or to establish categories in the patterns. Typically, recurrent and laterally connected networks use this alternative of learning.

Methodology

Preparation and characterization of ultradeformable liposomes

Timolol maleate-loaded liposomes containing edge-activator compounds were prepared using a thin-film dispersion method.

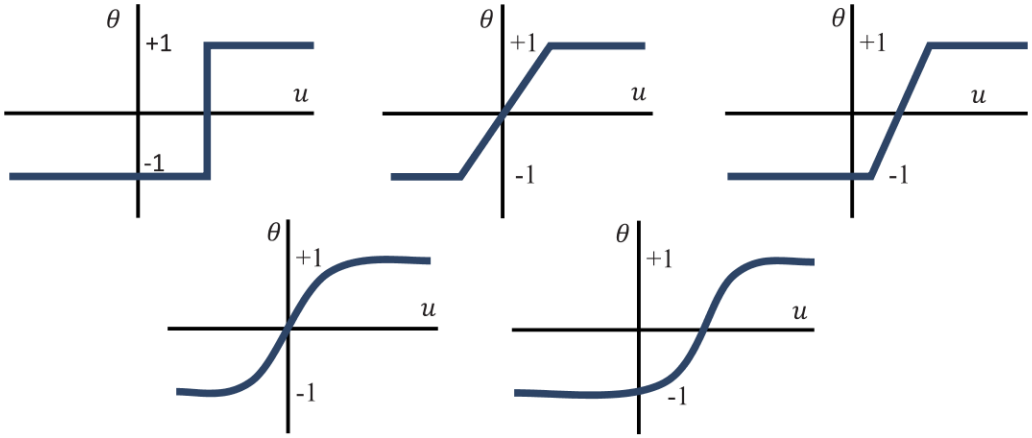


Figure 2. Different activation functions.

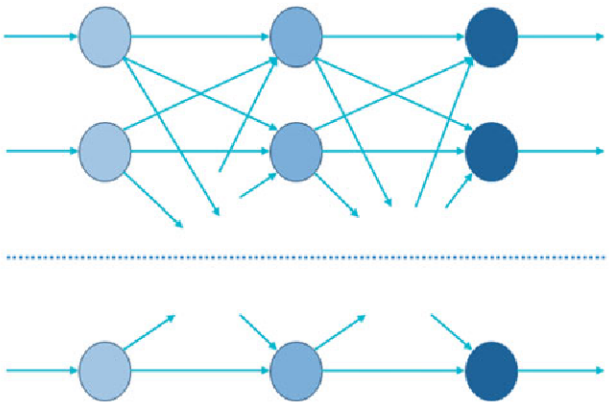


Figure 3. A layered neural network.

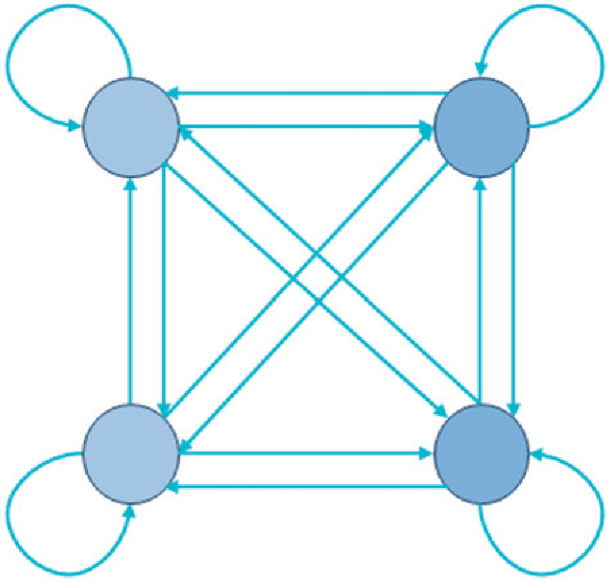


Figure 4. A recurrent network.

The protocol has been previously detailed as well as the production of extruded unilamellar vesicles [13], which were used for further characterization steps. Lipid components were dissolved in methanol:trichloromethane (0.73:1). After removing the solvent under rotary evaporation (Büchi R-210 with Heating Bath Buchi

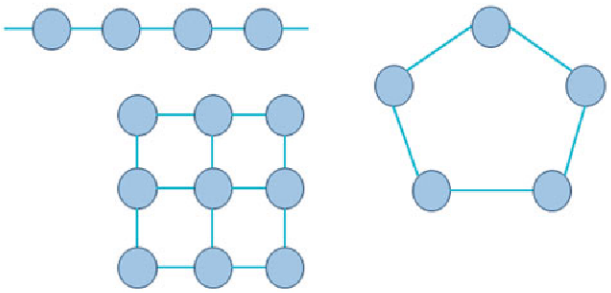


Figure 5. Different configurations of laterally connected neural networks.

B-491, Switzerland), the lipid film was hydrated and vortexed (Velp Scientifica Zx3) with 3 mL of Hepes buffer pH 7.4 containing 0.5 mg/mL of timolol. The formulation was quickly sealed in glass containers and stored in the dark at 4 °C.

The vesicle size (VS), polidispersity index (PdI) and zeta potential (Z) were determined by using a Zetamaster apparatus (Malvern Instruments, UK) at room temperature, as described by González-Rodríguez et al. [13]. PdI less than 0.2 indicates a homogeneous and monodisperse population, whereas larger PdI (>0.3) indicates heterogeneity.

Zeta potential was determined from electrophoretic mobility (μ) measurements. The mobility μ was converted to Z by the Smoluchowski equation:

$$\mathbf{Z} = \mu\eta/\varepsilon$$

where η is the viscosity and ε is the permittivity of the solution.

For all measurements, 200 µL of CL and DL formulations were diluted with Hepes solution (1/20).

Timolol-loaded vesicles were quantified in drug (PDE) after removing the unentrapped drug by centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804 R) at 10,000 rpm and 4 °C for 60 min, as previously has been described [13]. The whole supernatant was filtered and analyzed by HPLC for the drug content. In addition, the pellets of vesicles were disrupted with 0.5% w/v sodium dodecylsulfate aqueous solution and diluted for HPLC quantification after submitting the sample to a sonication process for 10 min and filtering.

The chromatographic apparatus consisted of a Hitachi Elite LaChrom equipped with a L-2130 isocratic pump, a diode array detector L-2455 and a L-2200 autosampler. For the chromatographic separation, a C18 column (Merck, RP-18 LichroCART (150 mm × 4 mm, 5 µm) was used. The analytical method based on

Table 1. Factors selected in the study, with the nomenclature and their levels.

Factor	Alias	Level (−)	Level (+)
Amount of cholesterol (μmol)	F1	20	27
Amount of edge-activator (mg)	F2	10	12
Phase in which TM was added	F3	PhO	PhA
Addition of stearylamine	F4	Yes	No
Type of edge activator	F5	Tween® 20	Deo-Na

deo-na: sodium deoxycholate; PhA: aqueous phase; PhO: organic phase; TM: timolol maleate.

isocratic conditions consisted in a mobile phase of ACN and sodium acetate (0.05 M) adjusted to pH 4.1 in 30/70 ratio (v/v). This mobile phase was previously filtered through nitrocellulose filter of 0.22 μm (Millipore, Barcelona, Spain). A flow rate of 2 mL/min, injection volume 10 μL and 45 °C as oven temperature were fixed for the analysis.

The entrapment parameter was calculated as follows:

$$PDE(\%) = \frac{Q_i}{F_t} \cdot 100$$

where PDE is the percentage of drug entrapped, F_t is the total amount of timolol in the sample and Q_i is the amount of drug retained into the vesicles.

The total recovery of drug in the prepared vesicle formulations was calculated from the following equation:

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{F_t}{F_i} \cdot 100$$

where F_i is the initial amount of timolol.

Five variables were selected to find the optimized conditions for maximizing PDE and surface charge (*Z*) and minimizing the vesicle size and PdI.

As the previous work, the causal factors (independent variables) chosen were the cholesterol amount (*F*1), amount of edge activator (*F*2), the location of the drug into the vesicle (*F*3), the addition of stearylamine (*F*4) and the type of edge activator (*F*5). The dependent variables or responses were vesicle size distribution (*Y*1), surface charge (*Y*2), PdI (*Y*3) and PDE (*Y*4).

In the screening stage, an orthogonal array L16 Taguchi was selected. Sixteen experiments resulted from combining the selected variables *F*1, *F*2, *F*3, *F*4 and *F*5 at two different levels, as shown in Table 1.

ANN modeling

From the available network topologies, a feedforward MPN was chosen, because of the higher leader capability of this ANN in problems with significant heterogeneity and nonlinearity. A different implementation, was proposed by Abraham et al. [5]. In this implementation, the output of a set of ANNs is a combination of the outputs of the different networks. Another one is the Neuro Fuzzy System approach, consisting in combined neural networks and fuzzy systems [21]. We have avoided these ways of using ANNs because they impose a great architecture complexity attributable to their configuration and the complexity of fine-tuning their parameters. We will study these configurations in a future research.

The use of multilayer perceptron with a back propagation network for designing ANN architecture has been widely extended. In essence, the structure consists of an input layer, one or more hidden layers and one output layer. Concerning the hidden layer, the use of at least one hidden layer enables the ANN to describe nonlinear systems and provide an adequate prediction, as postulated Woolfson et al. [22]. Each layer has some neural units that are interconnected by synapses. Each connection has assigned a strength connection known as 'weight.' In this manner, varying the weight values, a nonlinear relationship is generated by training the ANN, which can minimize the square error between the estimated and experimental data in the output layer.

Therefore, as MPN was used, the recommended methods are based in a supervised learning, by using backpropagation rule or generalized delta rule [23]. In this method, a pattern *p* is presented to the network whose initial weights have been randomly chosen. The error involved in each of the *n* neurons is calculated as follows, comparing the output o_{pk} of the neuron *k* with the desired output d_{pk} corresponding to that input pattern *p*:

$$E_p = \frac{1}{n}\sum_{k=0}^{n-1}\left(d_{pk} - o_{pk}\right)^2$$

The average error of the network for all *m* patterns is:

$$E = \frac{1}{m}\sum_{p=0}^{m-1} E_p$$

Then, the weights of the connections between previous layer and output layer are adjusted by an amount that is proportional to the error gradient. This amount is the learning rate:

$$\Delta w_{ik} = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ik}}$$

In order to reduce oscillations during the learning phase and consequently increase the convergence rate, a *momentum term* (θ) is used. This term needs to be high enough to reduce oscillations but not so high as to prevent learning. The total variation in the connection weight is:

$$\Delta w_{ik}(t) = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ik}} + \theta \Delta w_{ik-1}$$

As previously discussed, learning is closely linked to the number of neurons in the hidden layer. Thus, if this number of neurons is too high, learning time will be greater and, possibly, the network would be overtrained. This will lead to a network that has learned even particular features in the set of training patterns but is unable to generalize when new patterns are presented.

ANN configuration

Several features must be considered in a MPN: the input and output layers, the number of hidden layers, the number of neurons in each of these layers, the activation function and the percentage of known patterns that will be used to train the network. The remaining patterns will be used to test the error once the network has been trained.

This network comprises the following components:

- The **number of neurons** in the input and output layers that will be determined by the number of independent and dependent variables, respectively.
- The **number of hidden layers**, as the ways of interconnection between the input and output layer of processing units. This component is defined by the user, with the objective of maximizing the generalization ability without a great increase of complexity.
- The **number of neurons in the hidden layer**. In order to select the number of hidden neurons, one hidden neuron was selected and the number of neurons will be increased gradually until a network of minimum error for test data set was attained.

Table 2. L16 Taguchi orthogonal array used in this study.

Runs	F1 Amount of cholesterol	F2 Amount of edge activator (mg)	F3 Phase in which TM was added	F4 Addition of stearylamine	F5 Type of edge activator
1	−	−	−	−	−
2	−	−	−	+	+
3	−	−	−	−	+
4	−	−	−	+	−
5	−	+	+	−	+
6	−	+	+	+	−
7	−	+	+	−	−
8	−	+	+	+	+
9	+	−	+	−	+
10	+	−	+	+	−
11	+	−	+	−	−
12	+	−	+	+	+
13	+	+	−	−	−
14	+	+	−	+	+
15	+	+	−	−	+
16	+	+	−	+	−

(−): lower level of the factor; (+): higher level of the factor.

In the current study, the ANN was configured as follows:

a. Input layer, constituted by five neurons, corresponding to the number of input factors of DoE: *F*1, *F*2, *F*3, *F*4 and *F*5. In the current study, two different levels were used for each unit of input layer.
b. Output layer, includes eight neurons, dealing to the four output variables (responses) of DoE, before and after the extrusion process. Multilayer perceptron with a back propagation algorithm was used as ANN to predict four different response variables, such as vesicle size distribution (Y1), surface charge (Y2), polydispersity index (Y3) and the percentage of timolol entrapped (Y4). These values were considered before and after the extrusion process, which leads to eight neurons in the output layer.
c. Number of hidden layers. One hidden layer was chosen in this study because a significant difference was not observed in improving the performance by increasing the number of hidden layers to two or three.
d. Patterns. The study was initialized with the data array obtained by a DoE through L16 Taguchi matrix (Table 2) as screening tool, in order to identify significant formulation factors. In this particular case, this array corresponds to one half factorial design $2^{(5-1)}$ of resolution V. This means that no main effects and two-way interactions are confounded, but the effects of double interactions are confounded with threefold.
Each run was replicated three times, so 48 experiments were tested, each one with a set of input variables and their corresponding response variables. Consequently, there are 48 available patterns for training the network.
Feed-forward back propagation ANNs were fitted to the data obtained according to the L16 Taguchi orthogonal array. Data were divided into a training subset by selecting all 48 patterns. At this stage, a statistical ANOVA was performed to determine which test factors (main or interaction between main parameters) were statistically significant for each response, selecting those levels that produce an effect on the response clearly higher to the effect introduced by experimental error.
e. Number of neurons in the hidden layer. This parameter was established carrying out the experimentation with different number of hidden neurons. The assay was started with five hidden neurons that were gradually increased until a minimum error for the experimental data was attained. With the purpose to achieve the optimum number of hidden neurons, the network was tested 10 times with 5–14 neurons in the hidden layer.
f. Percentage of patterns used in ANN training. An additional objective of the study was to find the adequate percentage of patterns used to train the network and to validate its performance. Percentages of patterns 70%, 80% and 90% of 48 available experiments were analyzed.
g. Activation function. This network was programed in C language and Windows. The activation function must be derivable and a logistic model was selected in order to consider the possibility of non-linearity in the relationship between the inputs and the outputs:

$$f(z) = \frac{1}{1+e^{z}}$$

h. Other configuration parameters:

- Stopping condition 1:10,000 iterations. The network will not continue updating the weights of the connections after 10,000 iterations, in order to reduce the time of each experiment.
- Stopping condition 2: error = 0.01. The network will stop the updating of weights when the RMS (root mean square) error between the output pattern and the known output pattern is less or equal to one percent. This value is reached by the network with a high number of iterations and is chosen to avoid the overfitting of the weights to the set of training patterns.
- Stopping condition 3: Gradient = 0.00001. This value corresponds to the optimum error value, so weights cannot improve the response of the network.
- Learning rate: $\alpha = 0.1$. The amount of the weights modified for each iteration was 0.1.
- Momentum: 0.9. This value will reduce oscillations in the weights in a 10%, so learning will not be harmed.

Results and discussion

Multiple regression analysis

Results of this optimization study have been previously reported by González-Rodríguez et al. [13]. Briefly, experimental data corresponding to dependent variables (vesicle size, zeta potential, PdI and PDE) from the experimental L16 orthogonal array were

Table 3. ANOVA results for the main formulation factors, before and after the extrusion.

	Size before		Size after		PdI before		PdI after		ZP before		ZP after		PDE before		PDE after	
Source	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value	*F* ratio	*p* value
F1	197.2	<.001	553.5	<.001	63.49	<.001	4.132	**.05**	1.461	**.236**	229.3	<.001	2.793E +16	<.001	1.041E +15	<.001
F2	53.4	<.001	117.5	<.001	9.952	.003	2.058	**.161**	9.693	.004	267.7	<.001	4.333E + 15	<.001	1.292E +15	<.001
F3	43.63	<.001	73.96	<.001	64.58	<.001	0.1413	**.709**	6.952	.013	415.9	<.001	1.26E +15	<.001	3.098E +14	<.001
F4	613.3	<.001	969.9	<.001	1.061	**.311**	62.3	<.001	259.6	<.001	3563	<.001	1.17E +16	<.001	4.719E +15	<.001
F5	229.4	<.001	33.1	<.001	0.992	**.327**	1.072	**.308**	126	<.001	556.1	<.001	5.468E +14	<.001	1.03E +16	<.001

Bold numbers indicate non significant values.

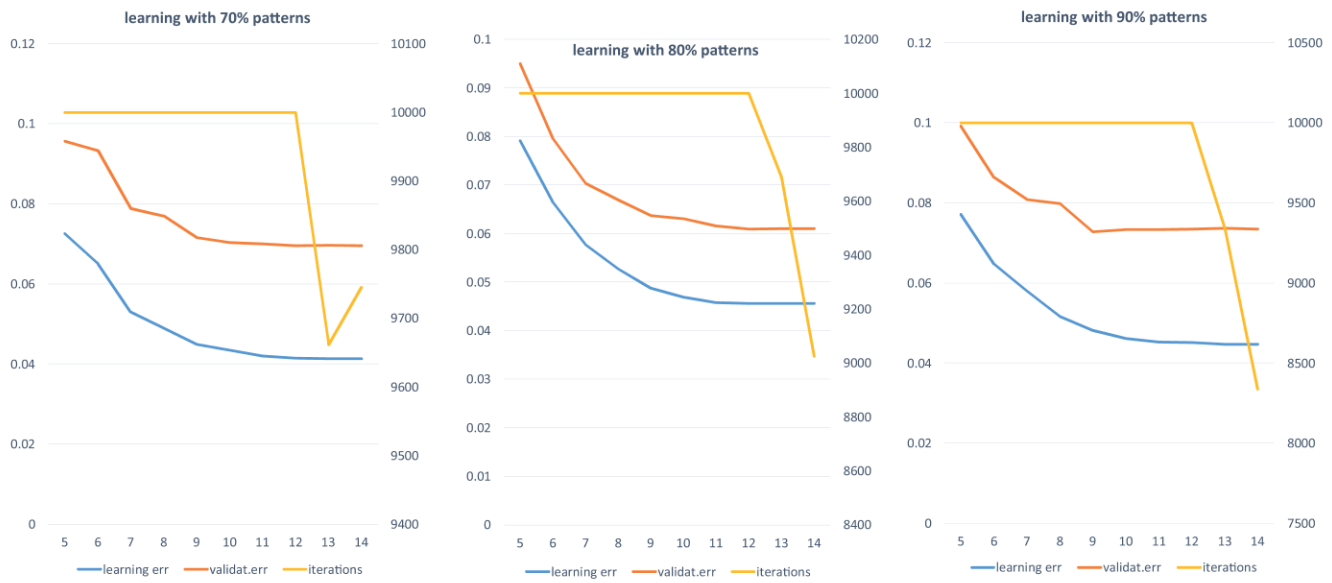


Figure 6. ANN training process. (A) With 70% of patterns. (B) With 80% of patterns. (C) With 90% of patterns.

subjected to multiple regression analysis to yield a second-order polynomial equation.

ANOVA results (Table 3) showed that when the coefficients of the five independent variables were compared to multiple regression [13], a goodness fit of the model, which was checked by the adjusted determination coefficient (adjR2), was achieved. The values obtained ranged from 0.79 to 0.999, being the lower values to PdI response, before and after liposomes were extruded. The most goodness of fit corresponded to PDE response, indicating a high significance of the model and an excellent correlation between the independent variables.

ANN model training and performance criteria

There are different training algorithms implemented for training the neural network. In the current study, the trials were carried out with different number of neurons in the hidden layer and different percentage of training/validation patterns. As recommended, we use partially the available data to train the network while keeping the remaining data to validate the network. Usually, 60–70% of data are used in the learning phase and 30–40% in the validation stage. Both data groups must be representative samples of the entire population. Only in that case, the network will learn adequately for validation. The impairment of a sufficient cross-sectioned sample will lead to small errors with the training patterns that increase in the presence of unknown patterns, giving rise to important inconsistencies of the model. Hence, it is not possible to assess that the error calculated with such a few number of patterns is of the same magnitude than when unknown patterns are used. Once finished the learning process, the ANN will be able to infer correctly the output of unknown input patterns.

In order to train the network, several trials were carried out with different number of neurons in the hidden layer [24]. As stated in Section ANN configuration, we trained the network using 5–14 neurons in the hidden layer. The optimum number of training cycles (iterations) was identified by training an ANN having a single hidden layer and monitoring the learning error and validation error. Figure 6 shows this information and the iterations by varying the percentage of patterns. The horizontal axis represents the number of neurons in the hidden layer. Left vertical axis represents learning and validation errors. Right vertical axis represents number of iterations. The altering number of hidden neurons and different percentage of training/validation patterns gave a total of 300 runs of the network. From averaged data for the 10 runs (Table 4) and the figure, we can notice that the validation error (red line) decreases while the number of neurons increases, until a certain value, from which it becomes asymptotic.

The training step is initialized by randomly assigning the weight to the hidden layer, and the input and output vectors are presented to the ANN. As training proceeds, the weights of the network gradually converge to values such that each input vector produces the desired output vector. Finally, the ANN was optimized with respect to the number of nodes in the hidden layer for providing a good predictive performance. For every architecture design, the predictive capability was assessed by comparing the number of hidden neurons that resulted in lower learning and validation errors. From figures, we can appreciate that the increase in the number of neurons requires a learning process with smaller number of iterations implied (yellow line). Therefore, an unnecessary number of neurons must be avoided, since they may overcharge, leading to errors in the inference phase.

As a conclusion to the training stage, the best results in terms of validation error have been obtained when the number of

Table 4. Training results with: (a) 70% of available patterns (34 learning, 14 validation). (B) 80% of available patterns (38 learning, 10 validation). (C) 90% of available patterns (43 learning, 5 validation).

N hidden neurons	Iterations	Learning error	Validation error
(A)			
5	10,000	0.0725975	0.0956266
6	10,000	0.0650939	0.093251
7	10,000	0.0530597	0.0788378
8	10,000	0.048943	0.0769575
9	10,000	0.0449553	0.0715593
10	10,000	0.0434548	0.0704067
11	10,000	0.0419971	0.0700615
12	10,000	0.0414444	0.0695542
13	9661.8	0.0414242	0.0696559
14	9745.4	0.0414188	0.0696192
(B)			
5	10,000	0.0790811	0.0949924
6	10,000	0.0664821	0.0796103
7	10,000	0.0577492	0.0703536
8	10,000	0.0527295	0.0669625
9	10,000	0.0487787	0.0636931
10	10,000	0.046868	0.0630337
11	10,000	0.0458152	0.061582
12	10,000	0.0456552	0.0609771
13	9690.4	0.0456547	0.061012
14	9025	0.0456194	0.0610673
(C)			
5	10,000	0.0771854	0.0992181
6	10,000	0.0647881	0.0863888
7	10,000	0.0579901	0.0808795
8	10,000	0.0516915	0.0798113
9	10,000	0.0481795	0.0727789
10	10,000	0.0461788	0.0733208
11	10,000	0.0452309	0.0733571
12	10,000	0.0451918	0.0735154
13	9339	0.0447212	0.0737072
14	8337.9	0.0447175	0.0734428

hidden neurons was 12 and the training phase used 80% of available patterns. A MPN feedforward network, consisting of one hidden layer with twelve neurons, was built with five inputs and eight outputs (often denoted as a 5:12:8 network).

The predictive capability of the developed ANN by using this twelve-node architecture for training allowed us to compare the effects of experimental designs [10]. In this study, the prediction of dimensional parameters, surface charge and drug entrapment efficiency based on the input formulation variables, derived from a mathematical model, is intended to reduce the formulation development process. Therefore, we can conclude that this tool works adequately for our purpose in predicting the behavior pattern or formulation parameters for deformable liposome formulations as nanocarriers.

Data obtained from some known samples (data not shown) were used to train the developed ANN model. The ANN model was composed of five neurons in the input layer and eight neurons in the output layer (Figure 7). This ANN is MNP type and fully interconnected. A good predictive performance has been obtained after calculate the hidden layer neurons, by optimizing the network with respect to the number of nodes in the hidden layer and selecting the minimum number of data points. The input vectors were the cholesterol amount, the type and amount of edge activator, the presence of stearylamine and the phase of incorporating the drug into the liposome. The targets were some physicochemical parameters (size, PdI, zeta potential) and PDE. So, predictions were used as input data sets to achieve all the responses.

To test the ANN performance, data corresponding to the output variables were introduced into the designed ANN and the

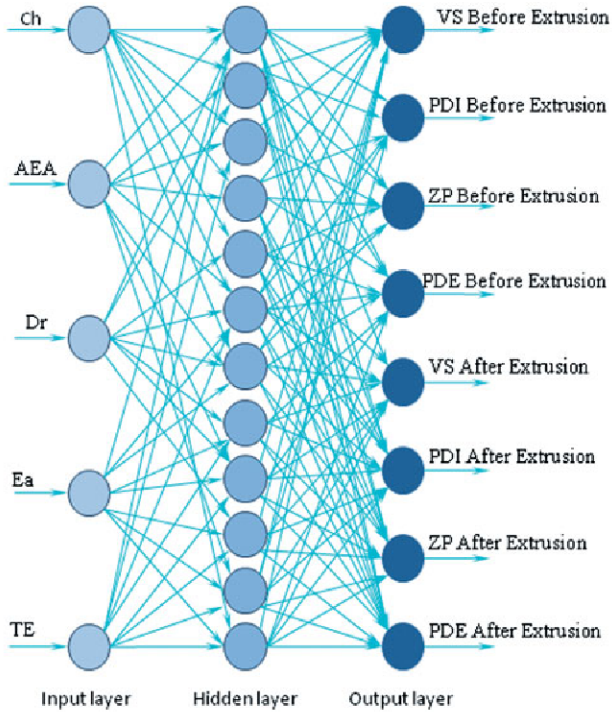


Figure 7. Schematic presentation of the ANN architecture designed and used for the optimization process in this study.

predicted formulation parameters were obtained. Prediction errors for the ANN must be reduced to a minimum and using this 12-node architecture for training, the predictive ability of the ANN was possible.

Table 5(A) illustrates the relationship between the ANN predicted (calculated) and observed value (confirmatory experiment) for all data set.

Lower prediction errors were obtained for PDE (0.03 and 0.047, before and after the extrusion process, respectively), considering to provide the higher overall predictive performance. In accordance to the ANOVA test, the higher prediction error was obtained for zeta potential, as a consequence of the variability of this parameter in the formulations.

As shown in Table 5, the results of the prediction errors for experimental versus predicted values using ANN model confirmed the good performance for ANN prediction of formulation parameters. Since the training result has been satisfactory, therefore, the ANN model has been effective in modeling the nonlinear input/output relationship in this system and was capable of predicting dimensional parameters, surface charge and PDE based on the device formulation [25].

Comparison of ANN and multiple regression tools

Various models are available for optimizing the formulation and processing variables during the development of novel drug delivery systems, including multiple regression analysis, response surface methodology, genetic algorithms and the ANN concept. Several significant advantages of ANNs compared to other statistical models, which require strictly structured experimental designs, are known. ANNs can use historical or incomplete data for predicting the responses and they can generalize the relationship between independent and dependent variables without a specific mathematical function.

Table 5. (A) Data of prediction error from ANN approach. Relationship between predicted (calculated) and observed (confirmatory experiment) values. (B) comparison of ANN with multiple regression analysis (MLR) and proposal of optimization methodology for the different responses.

(A)

Response	Optimized levels for parameters Ch/AEA/Dr/Ea/TE	Average expected value	Confirmatory experiment	Prediction error (%)
Before				
VS	1/−1/−1/1/−1	511.10	531.6	0.32
PDI	−1/1/−1/−1/−1	0	0.03	3.00
ZP	−1/1/1/1/1	16.32	16.1	1.36
PDE	1/1/1/1/1	86.373	86.4	0.03
After				
VS	−1/1/1/1/1	141.15	141.2	0.03
PDI	−1/1/1/1/1	0.113	0.1	1.30
ZP	1/1/−1/1/1	14.68	15.4	4.51
PDE	−1/−1/1/−1/1	10.653	10.7	0.047
			Avg error (%)	1.324

(B)

Response	Optimized levels for parameters Ch/AEA/Dr/Ea/TE	Average expected value	Confirmatory experiment	Prediction error (%)	Technique
Before					
VS	1/−1/−1/1/−1	511.10	531.6	0.32	ANN
PDI	−1/1/−1/−1/−1	0	0.03	3.00	ANN/MLR
ZP	−1/1/1/1/1	16.32	16.1	1.36	ANN
PDE	1/1/1/1/-1	86.373	86.4	0.03	ANN/MLR
After					
VS	−1/1/1/1/1	141.15	141.2	0.03	ANN/MLR
PDI	1/1/−1/1/1	0.113	0.1	1.3	ANN/MLR
ZP	1/1/−1/1/1	14.68	15.4	4.51	ANN
PDE	−1/−1/1/−1/1	10.653	10.7	0.047	ANN/MLR

Relationship between predicted (calculated) and observed (confirmatory experiment) values. (B) comparison of ANN with multiple regression analysis (MLR) and proposal of optimization methodology for the different responses.

In this work, the performance of the ANN model was validated and compared to that of the multiple linear regression and marginal means, previously reported by González-Rodríguez et al. [13], using the experimental data generated from Table 1.

Both ANN and MLR visualized different results in the average expected value of the output variables, as shown in Table 5(B). For checking the accuracy of these predictions, the optimized liposome formulations were prepared. Experimental results were comparable to predicted results in the case of PDE (prediction error <0.05). Also, the PdI was equally predicted by using MLR or ANN tools. However, the output 'size' before extrusion showed differences in predicting capability when MLR was applied, obtaining better results with ANN. Similar results were obtained for zeta potential values.

These remarks indicate that the ANN, trained with the described protocol, shows better predictive ability and accuracy than the MLR model, with lower prediction error in many cases. As we can see in Table 5, the prediction error is less than 3% in seven cases and 4.51% only in one case. It may also notice that the average error decreases by 0.5 points compared to previous results, which implies a reduction of 28.8%.

These findings are in accordance to Arulsudar et al. [26], who demonstrated that the ANN model provided more accurate prediction of formulation variables on PDE of liposomes encapsulating leuprolide and was quite useful in the optimization of pharmaceutical formulations when compared to multiple regression analysis method.

Conclusions

This study has demonstrated that the MLR using first-order polynomial equation and feed-forward back-propagation network (ANN) are useful tools to understand the effects of various formulation parameters in the preparation of timolol-loaded liposomes and to predict the best composition for a particular response. In addition, one method is complementary to the other, with each having its own advantages.

The use of ANNs is originated from the need of highly accurate predictions of parameters values without imposing a predefined model. Although other methods, like MLR in this work, give good results, they are not as adequate as those offered by ANNs in some cases.

The results of this study indicated that the appropriate selection of training algorithm is essential for successful data modeling by ANN. According to the results, ANNs can be used as a powerful tool in pharmaceutical product formulation, so that the development tasks can be rapidly and efficiently performed with an increase in productivity, consistency and quality. There are more complex architectures, using various neural network of different configuration working together that obtain excellent results but at higher cost for the design, the development of the parameters and training all the networks.

Models for characterizing parameters, such as vesicle size, polydispersity index, zeta potential and percentage of timolol entrapment were trained satisfactorily by ANN for all architectures and training algorithms. These prototypes were assessed with respect to their predictive ability and no significant differences were observed in the validation process.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

[1] González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, et al. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. J Pharm Sci. 2012;101:3845–3863.

[2] Singh G, Pai RS, Devi VK. Response surface methodology and process optimization of sustained release pellets using Taguchi orthogonal array design and central composite design. J Adv Pharm Tech Res. 2012;3:30–40.

[3] Subramanian N, Yajnik A, Murthy RS. Artificial neural network as an alternative to multiple regression analysis in optimizing formulation parameters of cytarabine liposomes. AAPS PharmSci Tech. 2004;5:11. doi:10.1208/pt050104

[4] Ghaffari A, Abdollahi H, Khoshayand MR, et al. Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. Int J Pharm. 2006;327: 126–138.

[5] Abraham A, Grosan C, Tigan S. Pharmaceutical drug design using dynamic connectionist ensemble networks. In: Itawa S, editor. Studies in computational intelligence, vol. 123. Berlin: Springer Heidelberg; 2008. p 221–231.

[6] Yasuda A, Onuki Y, Kikuchi S, et al. Self-organizing map analysis using multivariate data from theophylline powders predicted by a thin-plate spline interpolation. J Pharm Sci. 2010;99:4535–4542.

[7] Aksu B, Paradkar A, De Matas M, et al. A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. Pharm Dev Tech. 2013;18: 236–245.

[8] Ioele G, De Luca M, Dinç E, et al. Artificial neural network combined with principal component analysis (ANN-PCA) for resolution of complex pharmaceutical formulations. Chem Pharm Bull. 2011;59:35–40.

[9] Ajmani S, Janardhan S, Viswanadhan VN. Toward a general predictive QSAR model for gamma-secretase inhibitors. Mol Divers. 2013;17:421–434.

[10] Nemati P, Imani M, Farahmandghavi F, et al. Dexamethasone releasing cochlear implant coatings: application of artificial neural networks for modelling of formulation parameters and drug release profile. J Pharm Pharmacol. 2013;65:1145–1157.

[11] Wu J, Luo W, Wang X, et al. A new application of WT-ANN method to control the preparation process of metformin hydrochloride tablets by near infrared spectroscopy compared to PLS. J Pharm Biomed Anal. 2013;80:186–191.

[12] Huang Y, Yao Q, Zhu C, et al. Comparison of novel granulated pellet-containing tablets and traditional pellet-containing tablets by artificial neural networks. Pharm Dev Technol. 2015;20:670–675.

[13] González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, et al. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. Drug Dev Ind Pharm. 2016;42:1683–1694.

[14] Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. J Pharm Biomed Anal. 2000;22:717–727.

[15] Morris RG. D.O. Hebb: the organization of behavior, Wiley: New York; 1949. Brain Res Bull. 1999;50:437.

[16] McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of ideas immanent in nervous activity. Bull Math Biol. 1943;5:115–133.

[17] Rosenblatt F. Principles of neurodynamics: perceptrons and the theory of brain mechanisms. Neural Comput. 1957;2:25–34.

[18] Hopfield JJ. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. Proc Natl Acad Sci USA. 1982;79:2554–2558.

[19] Kohonen T. An adaptive associative memory principle. IEEE Trans Comput. 1974;23: 444–445.

[20] Hamming RW. Error detecting and error correcting codes. Bell Syst Techn J. 1950;29:147–160.

[21] Grosan C, Abraham A, Tigan S. 8th International Symposium on Symbolic and Numeric Algorithms for Scientific Computing (SYNASC'06), Timisoara, Romania. IEEE CS Press; 2006. p. 365–371.

[22] Woolfson AD, Umrethia ML, Kett VL, et al. Freeze-dried, mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide, dapivirine: optimisation by an artificial neural network. Int J Pharm. 2010;388:136–143.

[23] Widrow B, Hoff ME. 'Adaptive switching circuits'. Institute of Radio Engineers, Western Electronic Show and Convention, Convention Record, Part 4, 1960: 96–104.

[24] Krajišnik D, Stepanović-Petrović R, et al. Application of artificial neural networks in prediction of diclofenac sodium release from drug-modified zeolites physical mixtures and antiedematous activity assessment. J Pharm Sci. 2014;103: 1085–1094.

[25] Díaz-Rodríguez P, Landin M. Smart design of intratumoral thermosensitive β-lapachone hydrogels by artificial neural networks. Int J Pharm. 2012;433:112–118.

[26] Arulsudar N, Subramanian N, Murthy RSR. Comparison of artificial neural network and multiple linear regression in the optimization of formulation parameters of leuprolide acetate loaded liposomes. J Pharm Pharmac Sci. 2005;8: 243–258.

European Journal of Pharmaceutical Sciences 111 (2018) 186–194

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Ophthalmic administration of a 10-fold-lower dose of conventional nanoliposome formulations caused levels of intraocular pressure similar to those induced by marketed eye drops

C.M. Arroyo[a], D. Quinteros[b], M.J. Cózar-Bernal[a], S.D. Palma[b], A.M. Rabasco[a], M.L. González-Rodríguez[a,*]

[a] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, C/ Prof. García González, 2, 41012 Seville, Spain
[b] Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:
Deformable liposomes
Liposome
Maleate timolol
Intraocular pressure
Ophthalmic drug delivery

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the *in vivo* efficacy of several timolol (TM)-loaded liposomal formulations with current TM antiglaucoma treatment (aqueous 0.5% w/v eye drops).

In this study, conventional liposomes (CL) and deformable liposomes, without (DL1) and with ethanol (DL2) were prepared and characterized. In addition, *in vitro* release and permeation studies, as well as *in vivo* lowering intraocular pressure (IOP) and biocompatibility studies were performed.

It was found that the quali and quantitative lipid bilayer composition played a significant role in modifying the physical properties of vesicles. The deformability study and electronic microscopy images revealed that membrane elasticity of DL1 and DL2 was much higher than CL. However, *in vitro* permeation results showed that the flux and permeability coefficient were significantly higher in CL compared to DL.

The IOP study revealed that TM-loaded CL showed the best pharmacological activity, in comparison to deformable vesicles. Compared to the eye drops, CL formulation could equally reduce the IOP but using a concentration 10-fold lower, whereas the effective time was significantly longer. In addition, the formulations showed no irritant effects after instillation on the ocular surface.

1. Introduction

Glaucoma is an ocular disease characterized by the increase of the intraocular pressure (IOP), leading to the degeneration of axons from the retinal ganglion cells and the progressive loss of vision (Yu et al., 2015). Current therapies decrease IOP by reducing aqueous humor formation, or by increasing outflow of fluid through the uveoscleral pathway (Aggarwal and Kaur, 2005; He et al., 2013), or increasing the fluid outflow through the trabecular meshwork cytoskeleton, a novel strategy for drug targeting (Rasmussen and Kaufman, 2014).

Timolol maleate (TM) is a non-selective beta-adrenergic receptor blocking agent which has demonstrated to be effective in lowering IOP by decreasing aqueous humor flow (Jung et al., 2013). The conventional eye drops, in monotherapy or in dual-therapy, account for nearly 90% of currently marketed formulations due to their safety, simplicity and acceptance by patients (Gan et al., 2013; Abdel-Maaboud et al., 2014; Hafez et al., 2014).

The effectiveness of the marketed ocular TM products is restricted by extremely low bioavailability of the drug. Ophthalmic TM delivery has certain restrictions due to the structure of the eyeball: some instilled amount is absorbed by the conjunctiva, passing into the systemic circulation, without exerting its therapeutic effect; also, the frequent instillation can generate an excessive loss of drug through nasolacrimal drainage causing respiratory and cardiovascular side effects (Diggory et al., 1995). In addition, the mucin present in the tear film has a protective effect preventing tear evaporation due to the formation of a hydrophilic gel layer, but also this glycoprotein limits the penetration of the drug.

In order to overcome these drawbacks, current trends in ocular therapy suggest replacing the conventional forms with delivery systems that extend the contact time with the ocular surface, improving bioavailability and decreasing systemic absorption (Shafaa et al., 2011; Tuomela et al., 2014). In this field, adequate carrier systems act by following two main strategies: promoting the passage of the drug through the cornea increasing corneal permeability and prolonging the contact time (Järvinen et al., 1995; Tártara et al., 2012). It is achieved

* Corresponding author.
E-mail address: malugoro@us.es (M.L. González-Rodríguez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.024
Received 29 May 2017; Received in revised form 13 August 2017; Accepted 14 September 2017
Available online 18 September 2017
0928-0987/ Published by Elsevier B.V.

Table 1
Composition of liposomes in 3 mL aqueous solution. CLs: conventional liposomes; DL1: deformable liposomes; DL2: deformable liposomes containing ethanol.

Batch	EPC (μmol)	Ch (μmol)	SDC (μmol)	TM (μmol)	Ethanol (μL)	Water (μL)	Total lipids
CLs	68.0	27.0	–	4.7	–	3000	95
DL1	95.45	81.2	7.24	4.7	–	3000	183.89
DL2	95.45	81.2	7.24	4.7	45	2955	188.59

by using colloidal systems including nanoparticles (Diebold and Calonge, 2010) and liposomes (Gan et al., 2013), emulsions (Gallarate et al., 2013), prodrugs and penetration enhancers (Moghimipour et al., 2015; Elnaggar, 2015) among others.

Lipid-based nanocarriers provide numerous potential advantages as delivery systems for ophthalmic administration (Gan et al., 2013; Yu et al., 2015) since they act as bionic tear films (have similar properties). In this sense, the lipid composition may interact with the lipid layer of the tear film, allowing the carriers to remain in the conjunctival sac for a long time, where they act as drug reservoirs. Also, the ocular residence of drug-loaded lipid carriers may be prolonged through the adhesion effect of the polymers (Tan et al., 2017); finally, the composition of lipid nanocarrier may increase the corneal permeability, for example, liposomes and derivatives could inhibit the activity of P-glycoprotein in epithelial cells, with the opening of narrow junctions to improve drug penetration.

Liposomes are colloidal vesicles that are composed of concentric bilayers formed from self-assembly of amphiphilic molecules, such as phospholipids and cholesterol. The composition of these vesicles influences their physicochemical characteristics such as size, charge, thermodynamic phase, lamellarity and bilayer elasticity (Maestrelli et al., 2006; González-Rodríguez et al., 2007; González-Rodríguez and Rabasco, 2011).

These physicochemical properties, as well, are determinant in the behavior of the vesicles and, therefore, on their efficacy in drug delivery potentiation (Hironaka et al., 2009).

Once administered onto the ocular surface, liposomes act as a reservoir of drug remaining in the surface layer (Yu et al., 2015). In some circumstances, this effect become undesirable and modified liposomes have been designed, elastic vesicles capable of traversing mucous membranes without being destroyed (Romero and Morilla, 2013; Ascenso et al., 2015). They are deformable liposomes and transfersomes, nanovesicles composed of phospholipids and edge activators that confers them flexibility. Because of the presence of these substances, they can change their shape and transverse the corneal barrier in response to mechanical stress by relocating the edge activator inside the vesicle to zones with smaller curvature, thus reducing the membrane elastic energy to a minimal level. These modified vesicles have been widely studied for transdermal drug delivery whereas for ophthalmic drug delivery, fewer approaches have been published (Maestrelli et al., 2010; Cevc, 2012; Song et al., 2012; Mahmood et al., 2014).

The aim of the current study was to analyze the *in vivo* effectiveness of TM-loaded liposomes and transfersomes when they were applied to rabbit corneal epithelium, in terms of IOP decrease. The difference in composition and physicochemical properties of these lipid vesicles may contribute in enhancing the drug permeability and minimizing the dosage to be administered.

2. Materials and methods

2.1. Materials

L-α phosphatidylcholine from egg-yolk (EPC), cholesterol (Ch) and sodium deoxycholate (SDC) were purchased from Sigma-BioChemika (Steinheim, Germany). Timolol maleate (TM) and dodecylsulfate were purchased from Acofarma (Barcelona, Spain). Acetonitrile (ACN), trichloromethane, methanol, ethanol and 2 - [4 (2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (Hepes) were obtained from Panreac Química (Barcelona, Spain). Polycarbonate membranes with 800, 200 and 100 nm pore-size were purchased from Millipore (County Cork, Ireland). All other chemicals were of analytical degree.

2.2. Preparation of lipid vesicles

TM-loaded conventional liposomes (CL) were prepared by the lipid film-hydration method, by following the procedure previously detailed (González-Rodríguez et al., 2016) with slight modifications. Prepared vesicles and their compositions are exhibited in Table 1. Narrowly, EPC (final concentration of 22.7 mM) and Ch (final concentration of 9 mM) were dissolved in methanol:trichloromethane (0.73:1). After removing the solvent under rotary evaporation (Büchi R-210 with Heating Bath Buchi B-491, Switzerland), the balloon was kept overnight into a desiccator to ensure that the solvents were totally removed. Then, the lipid film was hydrated and vortexed (Velp Scientifica Zx3) with 3 mL of Hepes buffer pH 7.4 containing 0.5 mg/mL of TM. The formulation was quickly sealed in glass containers and stored in the dark at 4 °C.

Similar procedure was carried out to prepare deformable liposomes (DL1), using EPC (final concentration 31.8 mM), Ch (final concentration 27.1 mM) and SDC as edge activator (final concentration 2.4 mM and 13.25 molar ratio in relation to EPC). Slight modifications were introduced in the procedure. First, SDC and TM were dissolved in methanol and EPC and Ch were dissolved in trichloromethane. Afterwards, these organic solutions were mixed. All the products were kept at 4 °C until used.

Similarly, deformable liposomes containing ethanol (DL2) formulations were prepared as previously. The lipid film was hydrated with 3 mL of Hepes buffer pH 7.4 containing absolute ethanol (1.5% v/v).

Unilamellar nanoliposomes (LUV) were obtained by extruding the above samples through 800 and 200 nm pore sized polycarbonate membrane filters equipped in the Lipex Thermobarrel extruder (Northern Lipids Inc., Canada) under air flow.

Control liposomal formulations without TM were obtained by following the same methodology.

2.3. Characterization of liposomes

2.3.1. Vesicle size and zeta potential

The average size and polydispersity index (PdI) of vesicles were determined by dynamic light scattering technique by using a Zetasizer Nano-S equipment at room temperature (Malvern Instruments, Malvern, UK). PdI < 0.2 indicates a homogeneous and monodisperse population whereas larger PdI (> 0.3) indicates heterogeneity.

Zeta potential was determined from electrophoretic mobility (μ) measurements. The mobility μ was converted to Z by the Smoluchowski equation:

$$Z = \mu\eta/\varepsilon$$

where η is the viscosity and ε is the permittivity of the solution.

For both measurements, 200 μL of CL and DL formulations were diluted with Hepes solution (1/20).

2.3.2. Morphology

CL and DL were visualized by transmission electron microscopy (TEM) (ZEISS LIBRA 120). All samples (10 μL) were previously diluted with 1 mL of Hepes solution. Then, a drop of the diluted sample was left to dry on a microscopic copper-coated grid (transmission electron microscopy grid support films of 300 mesh Cu). After drying completely, a drop of an aqueous solution of uranyl acetate (1% w/v) was added for negative staining. Ten minutes later, the excess solution was wiped with filter paper and washed with purified water. Then, the specimen was viewed under the microscope with an accelerating voltage of 75 kV at different magnifications.

2.3.3. Percentage of drug entrapment

TM concentrations were estimated using an HPLC system (Hitachi Elite LaChrom) equipped with an L-2130 isocratic pump, a diode array detector L-2455 and an L-2200 autosampler. For data collection and calculation, EZChromElite Data System Software Manager was used. The chromatographic separation was performed following the methodology already published, by using the same specifications (González-Rodríguez et al., 2016).

The percentage of TM entrapment (PDE%) was obtained after removing the unentrapped TM by centrifugation in a cooling centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804 R) at 10,000 rpm at 4 °C for 60 min. The whole supernatant was filtered and analyzed by HPLC for the drug content. In addition, the pellets of vesicles were disrupted with 0.5% w/v sodium dodecylsulfate aqueous solution and diluted for HPLC quantification after submitting the sample to a sonication process for 10 min and filtering (Bhardwaj and Burgess, 2010).

This entrapment parameter was calculated as follows:

$$\mathrm{PDE}(\%) = \frac{Q_i}{F_t} \cdot 100$$

where PDE is the percentage of drug entrapped, F_t is the total amount of TM in the sample and Q_i is the amount of drug retained into the vesicles.

The total recovery of TM in the prepared vesicle formulations was calculated by the following equation:

$$\mathrm{Recovery}(\%) = \frac{F_t}{F_i} \cdot 100$$

where F_i is the initial amount of TM.

2.3.4. Vesicle elasticity

The bilayer elasticity of the prepared vesicles was measured by the extrusion method as reported earlier (González-Rodríguez et al., 2016). Briefly, samples were extruded for 1 min through a 100 nm pore size cellulose membrane filter by applying a pressure of 5 bar. The elasticity of the vesicles was calculated from the following equation:

$$E = j \cdot \left(\frac{r_v}{r_p}\right)^2$$

where E is the elasticity index of the vesicle bilayer; j is the rate of penetration through a membrane filter (the volume of sample extruded in 1 min); r_v is vesicle size (after extrusion); and r_p is the size of membrane pore.

2.3.5. Estimation of TM partition coefficient

Based on theoretical physicochemical properties of TM (log P 1.34–1.44, pKa 9.21), it is predictable that molecules distribute between the lipid bilayer and the aqueous continuous phase, and the concentration ratio between these two phases determines the drug partition coefficient, as was reported by Natarayan et al. (2012). This parameter was estimated from samples before the extrusion step.

Briefly, known volumes of samples were centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The drug estimated from the supernatant is a measure of continuous (buffer) phase drug concentration. This amount of drug subtracted from the total drug concentration yields drug partitioned into the bilayer. Thus, the drug partition coefficient (PC_D) into liposomes was estimated using the following expression:

$$PC_D = \frac{TM_T - TM_B}{TM_B}$$

where TM_T is the total amount of TM and TM_B is the amount of drug in buffer.

2.4. Stability studies

The physical stability of vesicles and the ability of them to retain the drug (*i.e.* drug retentive behavior) were assessed for 1 month at 2–8 °C. Samples were withdrawn periodically and analyzed for PDE, vesicle size, PdI and zeta potential.

2.5. In vitro release studies

The release tests of TM from liposome systems were carried out by the dialysis method. In this study, 1 mL of liposome dispersion was placed in a dialysis bag (Spectra/Por 4, molecular cut-off 12–14 kD), previously rinsed and soaked for 1 h, sealing both borders with a dialysis clip. The device was then incubated in 50 mL of artificial tears ($NaHCO_3$ 0.200% w/v, NaCl 0.670% w/v and $CaCl_2$ 0.008% w/v), maintaining the stirring rate at 100 rpm and 37 °C (IKA® RT10), thus reproducing partially the biological conditions (Rathore et al., 2010; Bhowmik et al., 2011). At predetermined time intervals, aliquots of dissolution medium were collected and replaced with equal volume of fresh medium. The amount of drug dissolved with time was quantified using the HPLC method previously described.

2.6. In vitro permeation studies

Permeation studies have been performed using Franz diffusion cells (diffusion area of 3.14 cm^2) by using hydrophilic polysulfone membranes (Tuffryn®; Pall Corporation, Port Washington, NY, USA). This membrane was impregnated with a gelatin solution (12% w/v) mimicking the high protein content of the stroma (mainly collagen), the widest and the main membrane of the cornea (which supposes the 90% of the total content). We selected gelatin at this concentration as protein model as resulting from the partial hydrolisis of collagen able to generate a flexible gelled film (Lee et al., 2004). The modified membrane was then saturated with the receptor phase (RP) for 30 min. Membranes were mounted between clamped donor and receptor compartments. The receptor compartment was filled with 14 mL of Hepes buffer solution (pH 7.4) and was maintained at 32 °C–37 °C under continuous stirring (SES-GmbH Analysesystemes, Germany). A fixed volume of each formulation (1 mL) was applied in the donor compartment under non-occlusive conditions and the permeation study was continued for 24 h. Samples of 1 mL were collected after 15 and 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, and 24 h according to International guidelines, being the same volume replaced with fresh RP kept at the same temperature. The samples were quantified by HPLC. In the reference cell, 1 mL of TM solution (0.5%) was used as control.

Data (n = 3) were expressed as cumulative amount of TM permeated through the membrane filter. The permeation (%) or *in vitro* ocular availability was calculated as follows (Krämer, 2016):

$$\mathrm{Permeation}\ (\%) = (\mathrm{Amount\ of\ drug\ permeated\ in\ RP} / \mathrm{Initial\ amount\ of\ drug\ in\ donor}) * 100$$

2.7. Hypotensive efficacy studies in vivo: IOP determination

In this experiment we have used 10 normotensive non sedated New

Zealand male white rabbits of 2–2.5 kg of weight each. Animal management procedures based on the resolution on the use of animals in research, established by the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the Institutional Committee of Care and Use of Animals for Research, from the Faculty of Chemistry in Córdoba National University, Argentina, were reviewed and the protocols were met. Rabbits were kept in individual cages, having free access to food and water, and were maintained in a controlled 12/12 h light/dark cycle. The formulations were applied in all 10 rabbits (n = 20 eyes) and each control was evaluated in 5 of them (n = 10 eyes). IOP was measured with a Tonovet rebound tonometer (Tiolat, Helsinki, Finland), and by using this technique, topical anesthesia was not required. For each eye, IOP was set at 100% with two basal readings taken 30 min before and immediately after the instillation. Then, a single dose of the formulation (50 μL) was applied to both eyes. IOP determinations were performed once every hour over the following 7 h. For control purposes, rabbits received the formulations without the hypotensive agent. The administration protocol included at least, a 48 h washout period between experiments.

2.8. Ocular irritation tests

2.8.1. Evaluation with the modified Draize method

The potential ocular irritancy and/or damaging effects of the developed formulation, in comparison to sodium dodecyl sulfate (SDS) solution in PBS 2% w/v (positive control), were evaluated using a slightly modified version of the Draize test (Draize et al., 1944). For this assay, twelve eyes of six male albino white rabbits of 2.0–2.5 kg of weight were used. A volume of 50 μL of test formulations was instilled into the conjunctiva sac of each eye (the rabbit's conjunctival sac capacity is ~30 μL). Another six rabbits were separated and used as control group, and they received a normal saline solution (NaCl 0.9% w/v) instilled in each eye. Pre- and post-exposure evaluations of the eyelids, conjunctiva, cornea and iris were performed by external observation with adequate illumination, and additional information was provided by examination using slit-lamp bio-microscopy (Kowa SL-14). To proceed with the observation, one drop of fluoresce in sodium salt (0.25% w/v) was instilled to contrast the potential corneal injury. The rating of ocular irritation or damage was scored (Table 2) for each observation at 30, 60, 120 and 180 min.

2.8.2. Histological examination

Based on the results described above and aiming to examine the effects on corneal structure and integrity, it was observed that the maximum irritation generated by SDS solution occurred 30 min after instillation. At that time, the animal was sacrificed, its corneas were removed and histological examination was performed. In order to get a point of reference, the effect of 0.9% w/v NaCl and SDS solutions in PBS 2% w/v were also evaluated in the same experimental conditions. After incubation, the corneas were washed with PBS and immediately fixed with a formalin solution 8% (w/w). The material was dehydrated with an alcohol gradient, put in melted paraffin and solidified in block form. Cross-sections (< 1 μm) were cut, stained with haematoxylin and eosin (H & E) and microscopically observed for any pathological modification (Baydoun et al., 2004).

Table 2
Score for potential corneal injury.

Score value	Formulation effect
0–8	No irritation
9–20	Mild irritation
21–40	Mild to moderate irritation
41–60	Moderate irritation
61–80	Severe injury
81–110	Very severe injury

2.9. Statistical analysis.

Student's *t*-test was used to compare the differences between groups. Results are given as mean ± SD and results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Reported as mean ± SD, the experiments were performed by triplicate.

The reduction was of an intraocular hypotensive kind, and it was expressed as means 6 standard error of the means (SEM). Also, other parameters as means 6 standard deviation (SD) were evaluated. Statistical differences between two mean values were evaluated by two-tailed student's *t*-test, and an analysis of variance (ANOVA) was applied when necessary. Results obtained were taken as significantly different at p-values, < 0.05.

3. Results

3.1. Characterization of vesicles

Uranyl acetate was used as negative stain for these samples, as it is an electron dense or opaque reagent for electrons. The reaction with the vesicles was suitably produced allowing visualization and differentiation of the vesicular membrane and lamellae. TEM study (Fig. 1) revealed that DL1 and DL2 exhibited irregular spherical shape, due to greater fluidity because the lipid bilayer was disturbed compared to other vesicles that were spherical in shape (CL). This occurs as an effect of the high deformability of the vesicular membranes allowing them to adapt their shape to the surrounding space.

The results of the analyzed parameters used to characterize all formulations were showed in Table 3. In optimizing vesicle formulations for ophthalmic application, these physicochemical properties are essential parameters, which constitute a decisive function in providing enhanced flux of drugs across the corneal membrane.

In relation to the vesicle size, two relevant factors have been evaluated to explain the obtained results. First, the difference in total lipids (mainly Ch) in these formulations has demonstrated that while the formulation CL contained 99.7 μmol (27 μmol of Ch), the formulations DL1 and DL2 were prepared with 183.89 (81.2 μmol of Ch) and 188.59 (81.2 μmol of Ch), respectively. This composition gives rise to smaller vesicles in the case of CL before extruding compared to deformable liposomes (data not shown). On the other hand, the presence of the edge activator into the lipid bilayer contributed to the recovery of vesicles after the extrusion process with higher diameter and lower PdI than CL. Our results were agreed with Duangjit et al. (2014), who concluded that the incorporation of the edge activator can reach higher curvature giving rise to deformable liposomes with larger vesicle size respect to conventional liposomes, despite 10–15% cholesterol was added. The vesicle size has been increased because of increasing the net repulsion force and reducing the van der Waals attraction forces between the lipid bilayers of liposomal systems (Liang et al., 2004).

The achievement of vesicle sizes > 250 nm in the case of DL2 can be attributed to the combined effect of the edge activator and the ethanol on deformability properties of the liposomes.

Concerning to the PdI, CL formulation showed values higher than 0.2 (heterogeneous population). When compared to DL1 (PdI = 0.199) and DL2 (PdI = 0.243), the crucial effect of edge activator on the recovery of more homogeneous vesicles was evident, mainly by adding the drug into the aqueous compartment, as DL1.

The surface charge was not significantly modified when the lipid bilayer was different. The slightly low negative values may be explained as a consequence of neutralizing all charged-compounds, such as EPC and SDC (negatively charged substances) with the drug (positively-charged compound), according to Shihui et al. (2015).

Concerning to the PDE parameter, the highest values were obtained in DL2 formulations. The vesicle size and the unilamellar structure of extruded liposomes contributed to the maintenance of TM entrapped into the aqueous compartment.

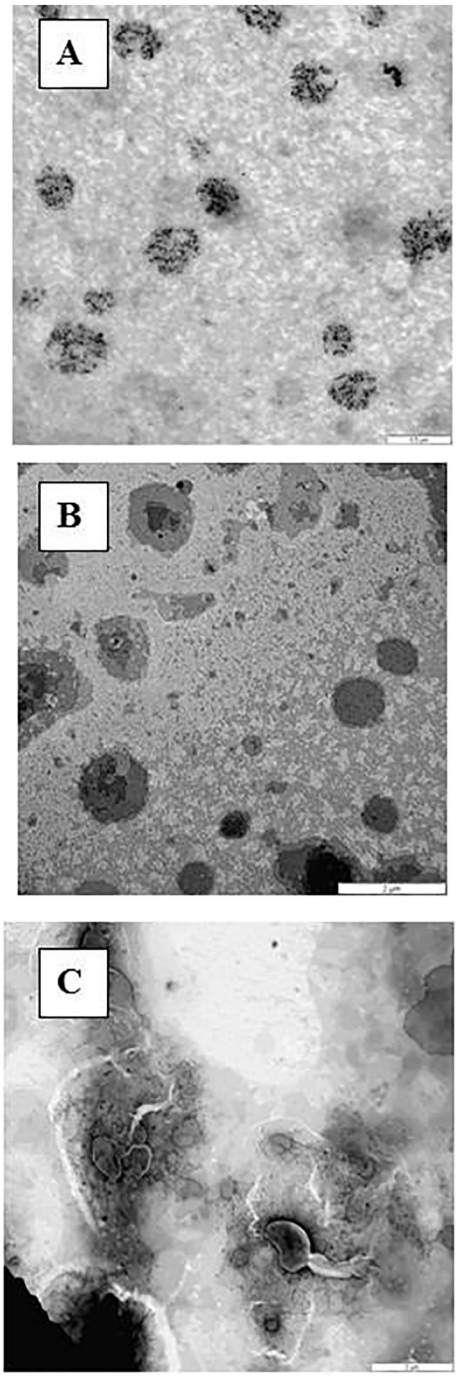


Fig. 1. TEM images of TM-loaded vesicles. A) Conventional liposomes (CL). B) Deformable liposomes (DL1). C) Deformable liposomes with ethanol (DL2).

3.2. Elasticity of vesicles

Elasticity is a key parameter for lipid vesicle penetration through the ocular barrier; therefore, it is critical that the nanocarrier system must be deformable to be able to pass easily through the corneal pores (Gupta et al., 2005; Song et al., 2012). The prepared formulations were subjected to the deformability study by following the extrusion method. The obtained values were expressed in terms of elasticity index using the equation reported in experimental section (Table 3). As logical, the CL showed the lower elasticity (0.936 μL·s·cm^{-2}) as compared to the flexible vesicles. The highest elasticity values showed in DL2 were according to other authors (Song et al., 2012). Although Ch increases packing density and rigidity of EPC molecules, which tends to reduce the elasticity of the vesicle bilayers (Elsayed et al., 2007; Gracià et al., 2010), the incorporation of edge activator SDC has a positive effect on the deformability properties because the higher radius of curvature increases this parameter. In addition, the presence of ethanol into the sample disturbs significantly the lipid bilayer, providing malleability and flexibility that allow liposomes to force more easily through the extruding filter (Ghanbarzadeh and Arami, 2013).

3.3. Drug partition coefficient

Partition coefficient (PC_D) is the ratio between the drug concentrations into the lipid phase to that in the continuous phase. A PC_D value of 4.22 ± 0.958 was estimated for conventional liposomes, in which TM was incorporated into the aqueous phase. This value was significantly higher than observed with DL1 (3.21 ± 0.741) and DL2 (3.19 ± 0.087), where a higher total lipid amount exists.

This result predicts the TM behavior concerning to the affinity of the drug to the lipid bilayer and the influence of lipid to aqueous phase ratio on this partition value.

3.4. Stability study

The stability studies of prepared liposomal formulations were carried out for 30 days.

Vesicle size of all extruded formulations increased by 25 nm approximately, and zeta potential changed in the range of about 5 mV over the storage period. These results are according to increased values of 20 nm presented by other authors (Meissner et al., 2015). TM was found to be stable among all the prepared liposomal formulations when analyzed in terms of vesicle size, PdI, zeta potential and drug entrapment in liposomes at 4 °C (Table 4).

3.5. In vitro release studies

The test was performed in artificial tears at 37 °C. As shown in Fig. 2, identical release kinetic of TM was obtained in all formulations: initially, a burst release phenomenon was observed, corresponding to the free molecules dissolved in the dissolution medium. Almost 90% of TM was released in 2 h. The faster release of drug was attributed to the free diffusion of drug from the core of liposomes to the release media and, despite the different composition, lipid vesicles are not the controlling factor for the drug release, but TM solubility.

3.6. In vitro permeation studies

In vitro permeation studies were performed for evaluating the influence of composition and drug disposition into the vesicles on drug permeation.

Table 3
Physicochemical properties of the prepared lipid vesicles.

Group	Size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)	Partition coefficient	Elasticity index (μL·s·cm^{-2})	PDE (%)
CL	151.0 ± 1.33	0.459 ± 0.02	−2.95 ± 0.27	4.22 ± 0.958	0.936 ± 0.020	17.652 ± 2.574
DL1	247.6 ± 4.73	0.199 ± 0.01	−2.03 ± 0.79	3.21 ± 0.741	2.296 ± 0.060	14.806 ± 5.471
DL2	354.9 ± 5.41	0.243 ± 0.19	−2.66 ± 0.29	3.19 ± 0.087	7.871 ± 0.258	26.690 ± 5.231

Table 4
Stability study realized for one month at 4 °C. Mean ± SD.

Days	Vesicle size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)	PDE (%)
CLs				
0	151.0 ± 1.33	0.459 ± 0.02	− 2.95 ± 0.27	17.65 ± 2.57
7	152.0 ± 2.11	0.489 ± 0.01	− 2.95 ± 0.14	14.81 ± 3.12
14	150.8 ± 2.58	0.550 ± 0.02	− 3.05 ± 0.13	15.20 ± 2.58
21	155.5 ± 1.95	0.702 ± 0.03	− 3.29 ± 0.10	15.74 ± 3.69
30	149.4 ± 3.12	0.317 ± 0.01	− 6.72 ± 0.15	19.09 ± 1.47
DL1				
0	247.6 ± 4.73	0.199 ± 0.01	− 2.03 ± 0.79	14.81 ± 5.47
7	240.6 ± 3.58	0.189 ± 0.02	− 2.33 ± 0.25	17.65 ± 3.65
14	230.6 ± 1.47	0.184 ± 0.03	− 2.58 ± 0.36	16.55 ± 4.11
21	229.8 ± 3.69	0.218 ± 0.05	− 3.84 ± 0.41	15.47 ± 6.54
30	222.1 ± 2.58	0.199 ± 0.08	− 5.65 ± 0.25	12.48 ± 5.68
DL2				
0	354.9 ± 5.41	0.243 ± 0.19	− 2.66 ± 0.29	26.69 ± 5.23
7	355.9 ± 6.11	0.293 ± 0.12	− 2.86 ± 0.15	27.69 ± 6.11
14	353.8 ± 4.23	0.300 ± 0.13	− 3.12 ± 0.20	27.80 ± 5.41
21	354.6 ± 6.87	0.363 ± 0.11	− 3.62 ± 0.23	30.46 ± 6.23
30	356.9 ± 5.12	0.197 ± 0.08	− 8.53 ± 0.25	29.50 ± 7.11

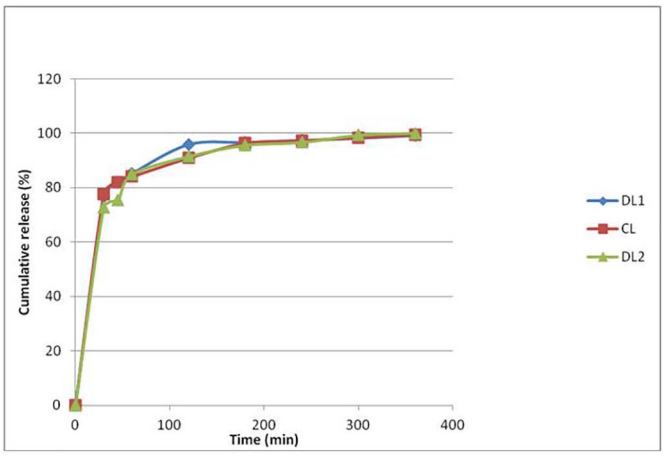


Fig. 2. The *in vitro* release profiles of TM from deformable liposomes (DL1 and DL2) and conventional liposomes (CL).

Equal amount of TM from different formulations, including solution, CL, DL1 and DL2 were tested on the artificial membrane surface in the donor compartment to evaluate their penetration ability through membrane. The amount of TM permeated over 24 h was plotted *versus* time.

Table 5 presents the permeation parameters of TM through membrane and accumulated amount of remained and permeated drug over 24 h from different formulations. The cumulative amount of drug permeated from vesicle formulations after 24 h was not significantly different than drug permeated from the aqueous solution ($p < 0.05$). However, the mean steady state flux (J_{ss}) and permeability coefficient (K_p) ranged from 0.3036 ± 0.008 (DL2) to 1.6467 ± 0.052 (control solution) μg/cm^2.min and 0.364 ± 0.009 (DL2) to 1.976 ± 0.001 (control solution) mm/h, respectively. Results indicated that the flux and permeability coefficient of TM solution and CL were 5- and 4-fold higher than DL2 formulation, respectively. Results also revealed that, compared to CL, the incorporation of edge activator and ethanol into the composition could significantly decrease the J_{ss} and K_{ps} up to 4 times. It can be concluded from the study that DL1 and DL2 could penetrate and deposit TM less than CL. High deposition percent indicated that these vesicles could provide a drug reservoir to prolong the effect of TM, according to other authors (Tsai et al., 2015).

Table 5
Ocular permeation parameters.

Formulation (Code)	Permeated amount at 24 h (μg/cm^2)	J_{ss} (μg/cm^2.min)	K_p (mm/h)
Control solution	144.78	1.647	1.976
CL	132.67	1.267	1.520
DL1	141.31	0.489	0.588
DL2	130.62	0.304	0.364

3.7. IOP measurement

Independent experiments were carried out in 10 rabbits (n = 10) to evaluate the hypotensive effect of each formulation. Two different concentrations of TM solutions (0.5 mg/mL and 5 mg/mL) were used as control samples. A single dose was tested on a single animal every day, and at least a 48 hour wash-out period between experiments was applied.

The effect of the TM formulations described in this paper was compared by using the maximum hypotensive effect of the drug (%), the area under the curve of the ΔIOP (%) *versus* time (h) from 0 to 7 h (AUC), and the mean time (h) in which the duration of the hypotensive effect was maintained.

All the vehicles containing TM were able to maintain the hypotensive effect of TM, providing different maximal effects and maximum percentage of IOP reduction, as it is shown in Table 6 and Fig. 3. Actually, the concentration of TM used commercially is 5 mg/mL but *in vivo* studies performed on rabbits, efficacy showed that the hypotensive effect of TM (0.5 mg/mL) was remarkably increased with the combination of CL or DL2. Taking the formulation TM 0.5 mg/mL as a solution reference (11.58% IOP reduction), significant differences in the maximal hypotensive effect were obtained with DL2 (20.06%, $p = 0.0072$) and CL (23.02%, $p = 0.0008$), as shown in Fig. 4. Thus, the efficacy was similar to TM concentration of 5 mg/mL (24.47% IOP reduction) when using a drug concentration ten-fold lower.

The AUC of TM 0.5 mg/mL solution was significantly lower than the values obtained with DL2 and CL ($p = 0.0072$ and 0.0008, respectively).

Concerning the mean time effect, the reference formulation 0.5 mg/mL lasted approximately 4 h. This effect was exceeded by the formulation which contained ultra-deformable and conventional liposomes, which effect lasted approximately 5 and 7 h, respectively.

3.8. Ocular irritation assays

3.8.1. Modified Draize method

Before the experiment was performed, all rabbits showed a normal ocular surface with a transparent cornea. Both formulations can be considered non-irritating because they presented a score lower than 10. After instillation, the SDS solution produced a noticeable irritation with a score higher than 60. On any of the tested formulations, conjunctival disorders can be appreciated, including hyperemia or edema, eyelid swelling, or intense blinking. However, animals showed no discomfort

Table 6
Pharmacokinetic and pharmacological parameters evaluated of the different formulations. [TM] = 0.5 mg/mL.

Formulation	Mean time (h)	Maximal IOP reduction (%)	AUC_0^{7h} (%.h)
TM solution (5 mg/mL)	5	24.47 ± 1.85	71.78 ± 7.08
TM solution (0.5 mg/mL)	4	11.58 ± 2.58	32.13 ± 7.70
DL2	5	20.06 ± 2.89*	63.80 ± 12.82*
CLs	7	23.02 ± 1.38*	86.14 ± 7.26*

* Significant differences with solution [TM] 0.5 mg/mL (p-value < 0.05).

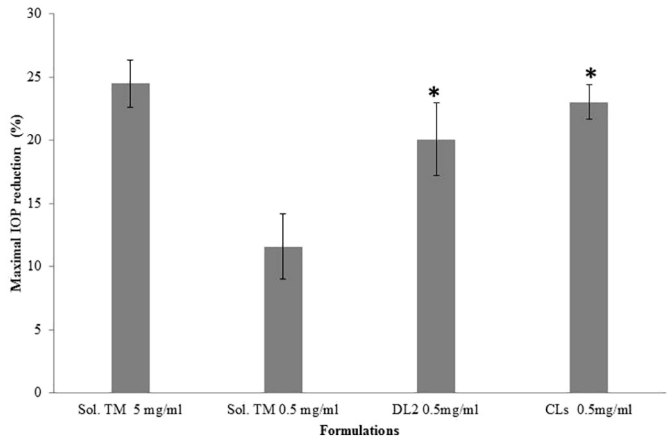


Fig. 3. Maximal hypotensive effect (% ± S.E.M) of solution [TM] 5 mg/mL and [TM] 0.5 mg/mL and DL2 and CL with [TM] 0.5 mg/mL. *Significant differences with solution [TM] 0.5 mg/mL (p-value < 0.05).

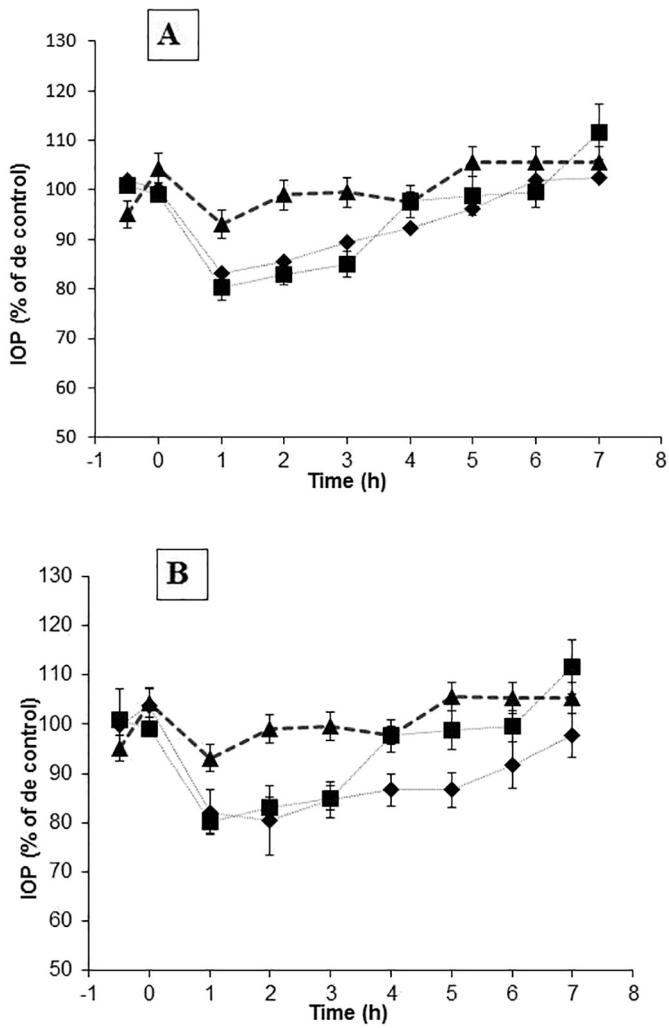


Fig. 4. IOP profiles of (▲) Solution [TM] 0.5 mg/mL; (■) Solution [TM] 5 mg/mL and **A)** (◆) DL2 [TM] 0.5 mg/mL. **B)** (◆) CL [TM] 0.5 mg/mL.

or irritation during the test. The cornea remained transparent (no vessels) throughout the assay and the coloration of the conjunctiva remained normal. No secretions of mucus were seen on any animal. On the contrary, the SDS solution produced a noticeable irritation with a score higher than 60, reaching its peak at 30 min after instillation, and then, the irritant effect decreased as time passed.

3.8.2. Histological examination

Fig. 5 shows the cross-sections of corneas after the administration of different formulations. In Fig. 5A, it is shown that, apparently, no changes appeared on the epithelium and stroma structures when NaCl solution was administered, but some typical stratified layers can be recognized, due to the rise of a bulge in the nuclei of the basal columnar cells, as well as the squamous on the surface of them. In Fig. 5B, it is shown the damage of the corneal epithelium structure when exposed to SDS solution, due to obvious changes in superficial cells. No morphological or structural changes could be seen in Fig. 5C and D, neither in the structure nor in the integrity of the corneas, even when they were visibly affected. These results revealed that the formulations of CL and DL2 had a high biocompatibility.

4. Discussion

Decreased IOP remains the key adjustable risk factor in glaucoma. The main treatment of glaucoma is based on topical medications for reducing the IOP, thus delaying damage to the optic nerve due to elevated IOP. However, periodic application, because of poor ocular bioavailability and other long-term side effects such as allergy and intolerance to medications, imply negative effects on patient compliance, leading to poor adherence of the patient to medication and to the progression of the disease resulting in poor IOP control.

In the present study, we investigated the *in vitro* permeation and *in vivo* ocular effect of TM-loaded from different types of lipid vesicles: conventional liposomes (CL) and deformable vesicles with either an edge activator (DL1) or an edge activator together with a permeation enhancer (DL2). The properties in terms of structure, vesicle size, surface charge, PdI, percentage of drug entrapped, elasticity, partition coefficient, release behavior, *in vitro* permeation studies and *in vivo* corneal studies, were examined.

Theoretically, DL2 composition (a permeation enhancer, ethanol, together with SDC as edge activator) make these vesicles to provide improved permeation characteristics compared to DL1 and CL. Ethanol interacts with lipid molecules in the polar head group region, resulting in a reduced phase transition temperature (TM) of the corneal lipids and higher fluidity which provides an increase in the membrane permeability. Ethanol may also provide malleability and flexibility to the vesicles, and it allow them forcing more easily and penetrating into the deeper layers of the eye. In addition, during permeation process, the edge activator (SDC) is demixed from the lipid bilayer and displaced to relocate in the zones of higher curvature/stress, whereas the more hydrophobic amphiphilic molecules enrich the bilayer regions with a smaller curvature. These rearrangements are the cause of the decrease of the membrane elastic energy and the formation of structures that are more deformable than CL by up to five orders of magnitude. In this sense, DL2 reported higher values, which imply improved elasticity compared to both CL and DL1, as revealed TEM images, could be due to the combined effect of ethanol content and SDC in these vesicles.

However, no correlation exists between the elasticity properties and the enhanced permeation behavior of DL. The influence of total lipid amount on the drug permeation and, therefore, the vesicle size, was evident.

The observed results of CL are correlative with *in vitro* permeation results, which showed a slow and sustained release of TM. Concerning the vesicle composition, the presence of Ch in different mol% can affect to the drug diffusion. Taking into account that the mol% was higher in DL2 (44.17 *versus* 27.08 mol%) and that the presence of this steroid to a lipid bilayer strongly influence its thermodynamic and mechanical properties by decreasing the passive permeability of the bilayer, we can explain why TM release was slower and incomplete as Ch concentration increased (Khajeh and Modarress, 2014). In addition, TM has a high partition coefficient (log P 1.34–1.44) and the solubility-diffusion

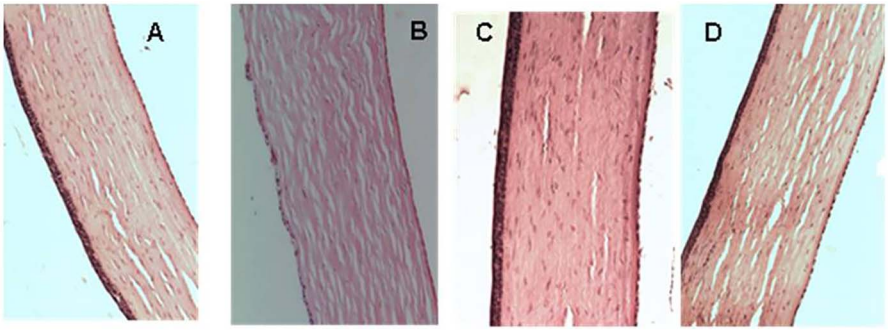


Fig. 5. Histological cross-sections of excised rabbit cornea showing epithelium and stroma stained with hematoxylin & eosin. (A) 0.9% w/v NaCl solution, (B) 2% w/w SDS solution, (C) CL and (D) DL2.

mechanism is probably a key factor in the permeation of TM molecules (Boggara and Krishnamoorti, 2010). The disposition of drug into the bilayer favours the diffusion to the dissolution medium meanwhile the drug entrapped into the aqueous phase is maintained as reservoir into the vesicle for a longtime, as occurs in CL.

The hypothesized effect of the ionization characteristics of TM in aqueous medium on the diffusion through lipid bilayers can be explained according the study proposed by Ulander and Haymet (2003) for valproic acid into DPPC vesicles. TM has pKa 9.21 and was mainly protonated at pH 7.4. As the charged timolol approached the bilayer, the headgroups polarize, and at the same time permit water fingers protruding into the bilayer to relax the electrostatic penalty from desolvation. Additional important contributions were proposed by Carrozzino and Khaledi (2005) who postulated the effect of pH on drug interactions and lipid bilayers. The electrostatic interactions due to the functional groups persisting in the TM have a key function in the partition coefficient, which is dependent on the extent of solute ionization as determined by the pH. At physiological pH (7.4), TM is positively charged and is electrostatically attracted by liposome lipids that carry a net negative charge. This fact could explain the practically neutral zeta potential values obtained in this study.

The *in vivo* results revealed that a single topical application of TM (0.5 mg/mL)-loaded EPC liposomes could effectively reduce the IOP in rabbit's eyes for at least 7 h. This IOP-lowering effect was significantly greater than topical administration of TM solution 0.5 mg/mL, and the same effect than the current standard treatment in glaucomatous patients (5 mg/mL).

The mechanism of permeation through cornea can explain the behavior of this formulation. A combined transcellular and paracellular mechanism might be attributable to TM as a function of its partitioning and water solubility properties. Permeability studies indicated that as the corneal epithelium is lipophilic, low in porosity and relatively high in tortuosity (Malhotra and Majumdar, 2001), a rapidly penetrating drug must possess log partition coefficient > 1 in order to assess to achieve a sufficient penetration rate. In this study, for hydrophilic drugs, such as TM, with log partition coefficient of 1.34–1.44, the epithelium and stroma contribute to a significant enhancement of permeation.

On the other hand, ethanol and SDC have been shown to improve transcorneal drug penetration. Certainly, their potential benefits in improving the poor topical bioavailability of ophthalmic drugs, has been reported. SDC, a bile salt, is an anionic surfactant. In general, these types of adjuvants, at low concentrations, are added into the lipid bilayer, with consequent changes on the physical properties of the cell membranes (Moghimipour et al., 2015). When the bilayer becomes saturated, mixed micelles are formed, causing the removal of phospholipids from the cell membranes and the membrane solubilization (Stojancevic et al., 2013). Also, SDC can increase the paracellular transport by disruption of the hemidesmosomes or by binding to Ca^{2+} in the regions of tight junctions (Shaikh et al., 2012). Simultaneously, ethanol may disorder the structure of the ocular lipid bilayer and enhance its lipid fluidity, as it has been widely reported in the literature (López-Pinto et al., 2005; Patra et al., 2006).

As expected, tested formulations were adequately tolerated on the ocular surface. However, their use should be considered with caution since these ocular penetration enhancers can cause ultrastructural changes in the corneal epithelium. Studies showed that SDC is intensively ciliotoxic and at a concentration of 1%, is irritant and causes corneal damage (Saettone et al., 1996). Similarly, ethanol can cause an irritant effect on cornea with repetitive use.

Regarding the reduction of IOP in rabbit eyes, the results obtained are encouraging. To date, no other studies show such a significant effect of TM sustained-release using liposomes in the animal eye, at a concentration of TM ten times lower than control solution. The size of these nanocarriers could also be a key choice in drug delivery through the various anatomical structures of the eye (conjunctiva and sclera) to reach the targeted site (ciliary body) more efficiently, with increased bioavailability.

Certainly, in the case of ophthalmic drug products, it is difficult to develop a reliable *in vitro* predictive model. Despite the existence of precorneal constraints of the eye, such as continuous clearance of dosage forms and the released drug from the cul-de-sac area through tear drainage, tear dilution and lacrimation, our study showed a good correlation in terms of *in vitro* permeation parameters and therapeutic effect obtained. This concordance makes the permeation protocol selected as appropriate for further studies by using this route.

In addition, data from *in vitro* experiments are useful for a rational extrapolation to *in vivo* prediction in order to minimize the use of animal testing, which is limited due to ethical, economical and technical reasons.

5. Conclusions

This study showed that the combinatory effect of penetration enhancer (ethanol) and surfactant (SDC) increased the elasticity of vesicles. However, according our *in vivo* results, the conventional liposomes showed an extended hypotensive effect compared to other liposomal formulations. The maintenance of depot system onto the corneal membrane becomes crucial for prolonging the IOP lowering.

The current work emphasizes that the use of lower dosage of TM (0.05% w/v) than marketed eye drops (0.5% w/v), strongly enhances the pharmacological and toxicological profile of TM from liposomal ophthalmic formulations.

Overall, these *in vivo* findings indicate that TM-loaded liposomes have great potential to deliver the drug through the corneal membrane. However, *in vivo* results demonstrated that in addition of *in vitro* characterization and evaluation, also the physiological and toxicological aspects of corneal epithelium must be taken into account in order to adequately predict the *in vivo* behavior.

References

Abdel-Maaboud, I.M., Abdel-Wadooda, H.M., Mousab, H.S., 2014. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: a novel salting out

liquid–liquid microextraction combined with HPLC. Talanta 130, 495–505.
Aggarwal, D., Kaur, I.P., 2005. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. Int. J. Pharm. 290, 155–159.
Ascenso, A., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Praça, F.G., Bentley, M.V., Simões, S., 2015. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. Int. J. Nanomedicine 10, 5837–5851.
Baydoun, L., Furrer, P., Gurny, R., Muller-Goymann, C.C., 2004. New surface-active polymers for ophthalmic formulations: evaluation of ocular tolerance. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58, 169–175.
Bhardwaj, U., Burgess, D.J., 2010. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. Int. J. Pharm. 388, 181–189.
Bhowmik, M., Das, S., Chattopadhyay, D., Ghosh, L.K., 2011. Study of thermo-sensitive in-situ gels for ocular delivery. Sci. Pharm. 79 (2), 351–358.
Boggara, M.B., Krishnamoorti, R., 2010. Partitioning of nonsteroidal antiinflammatory drugs in lipid membranes: a molecular dynamics simulation study. Biophys. J. 98, 586–595.
Carrozzino, J.M., Khaledi, M.G., 2005. pH effects on drug interactions with lipid bilayers by liposome electrokinetic chromatography. J. Chromatogr. A 1079, 307–316.
Cevc, G., 2012. Rational design of new product candidates: the next generation of highly deformable bilayer vesicles for noninvasive, targeted therapy. J. Control. Release 160, 135–146.
Diebold, Y., Calonge, M., 2010. Applications of nanoparticles in ophthalmology. Prog. Retin. Eye Res. 29, 596–609.
Diggory, P., Cassels-Brown, A., Vail, A., Abbey, L.A., Hillman, J.S., 1995. Avoiding unsuspected respiratory side-effects of topical timolol by using cardioselective or sympathomimetic agents. Lancet 345, 1604–1606.
Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 82, 377–390.
Duangjit, S., Obata, Y., Sano, H., Onuki, Y., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Takayama, K., 2014. Comparative study of novel ultradeformable liposomes: menthosomes, transfersomes and liposomes for enhancing skin permeation of meloxicam. Biol. Pharm. Bull. 37 (2), 239–247.
Elnaggar, Y.S., 2015. Multifaceted applications of bile salts in pharmacy: an emphasis on nanomedicine. Int. J. Nanomedicine 10, 3955–3971.
Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., 2007. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. Int. J. Pharm. 332, 1–16.
Gallarate, M., Chirio, D., Bussano, R., Peira, E., Battaglia, L., Baratta, F., Trotta, M., 2013. Developmentof O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. Int. J. Pharm. 440, 126–134.
Gan, L., Wang, J., Jiang, M., Bartlett, H., Ouyang, D., Eperjesi, F., Liu, J., Gan, Y., 2013. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov. Today 18 (5/6), 290–297.
Ghanbarzadeh, S., Arami, S., 2013. Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium via conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes. Biomed. Res. Int. 2013, 616810. http://dx.doi.org/10.1155/2013/616810.
González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., 2011. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. Expert Opin. Drug Deliv. 8 (7), 1–15.
González-Rodríguez, M.L., Barros, L.B., Palma, J., González-Rodríguez, P.L., Rabasco, A.M., 2007. Application of statistical design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. Int. J. Pharm. 337, 336–345.
González-Rodríguez, M.L., Arroyo, C.M., Cózar-Bernal, M.J., González-R, P.L., León, J.M., Calle, M., Canca, D., Rabasco, A.M., 2016. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. Drug Dev. Ind. Pharm. 42 (10), 1683–1694.
Gracià, R.S., Bezlyepkina, N., Knorr, R.L., Lipowsky, R., Dimova, R., 2010. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. Soft Matter 6, 1472–1482.
Gupta, P.N., Mishra, V., Rawat, A., Dubey, P., Mahor, S., Jain, S., Vyas, S.P., 2005. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. Int. J. Pharm. 293 (1), 73–82.
Hafez, H.M., Elshanawane, A.A., Abdelaziz, L.M., Mohram, M.S., 2014. Development and validation of HPLC method for simultaneous estimation of brimonidine tartrate and timolol maleate in bulk and pharmaceutical dosage form. J. Appl. Pharmacol. 6 (4), 398–407.
He, W., Guo, X., Feng, M., Mao, N., 2013. In vitro and in vivo studies on ocular vitamin A palmitate cationic liposomal in situ gels. Int. J. Pharm. 458, 305–314.
Hironaka, K., Inokuchi, Y., Tozuka, Y., Shimazawa, M., Hara, H., Takeuchi, H., 2009. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. J. Control. Release 136, 247–253.
Järvinen, K., Järvinen, T., Urtti, A., 1995. Ocular absorption following topical delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 16, 3–19.
Jung, J.H., Abou-Jaoude, M., Carbia, B.E., Plummer, C., Chauhan, A., 2013. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone–hydrogel contact lenses. J. Control. Release 165, 82–89.
Khajeh, A., Modarress, H., 2014. The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta 1838, 2431–2438.
Krämer, S.D., 2016. Quantitative aspects of drug permeation across in vitro and in vivo barriers. Eur. J. Pharm. Sci. 87, 30–46.
Lee, K., Shim, J., Lee, H., 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. Carbohydr. Polym. 56, 251–254.
Liang, X., Mao, G., Ng, K.Y.S., 2004. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. J. Colloid Interface Sci. 278, 53–62.
López-Pinto, J.M., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., 2005. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. Int. J. Pharm. 298, 1–12.
Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Mura, P., 2006. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int. J. Pharm. 312, 53–60.
Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Ghelardini, C., Mura, P., 2010. New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. Int. J. Pharm. 395, 222–231.
Mahmood, S., Taher, M., Mandal, U.K., 2014. Experimental design and optimization of raloxifene hydrochloride loaded nanotransfersomes for transdermal application. Int. J. Nanomedicine 9, 4331–4346.
Malhotra, M., Majumdar, D.K., 2001. Permeation through cornea. Indian J. Exp. Biol. 39, 11–24.
Meissner, J.M., Toporkiewicz, M., Czogalla, A., Matusewicz, L., Kuliczkowski, K., Sikorski, A.F., 2015. Novel antisense therapeutics delivery systems: in vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. J. Control. Release 220, 515–528.
Moghimipour, E., Ameri, A., Handali, S., 2015. Absorption-enhancing effects of bile salts. Molecules 20, 14451–14473.
Natarayan, J.V., Ang, M., Darwitan, A., Chattopadhyay, S., Wong, T.T., Venkatraman, S.S., 2012. Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. Int. J. Nanomedicine 7, 123–131.
Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B.W., Holopainen, J., Karttunen, M., 2006. Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. Biophys. J. 90, 1121–1135.
Rasmussen, C.A., Kaufman, P.L., 2014. Exciting directions in glaucoma. Can. J. Ophthalmol. 49, 534–543.
Rathore, K.S., Nema, R.K., Sisodia, S.S., 2010. Preparation and characterization of timolol maleate ocular films. Int. J. Pharm. Technol. Res. 2 (3), 1995–2000.
Romero, E.L., Morilla, M.J., 2013. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. Int. J. Nanomedicine 8, 3171–3186.
Saettone, M.F., Chetoni, P., Cerbai, R., Mazzanti, G., Braghiroli, L., 1996. Evaluation of ocular permeation enhancers: *In vitro* effects on corneal transport of fourβ-blockers, and *in vitro/in vivo* toxic activity. Int. J. Pharm. 142, 103–113.
Shafaa, M.W., Sabra, N.M., Fouad, R.A., 2011. The extended ocular hypotensive effect of positive liposomal cholesterol bound timolol maleate in glaucomatous rabbits. Biopharm. Drug Dispos. 32 (9), 507–517.
Shaikh, M.S.I., Derle, N.D., Bhamber, R., 2012. Permeability enhancement techniques for poorly permeable drugs: a review. J. Appl. Pharm. Sci. 2, 34–39.
Song, C.K., Balakrishnan, P., Shim, C.K., Chung, S.J., Chong, S., Kim, D.D., 2012. A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation. Colloids Surf. B: Biointerfaces 92, 299–304.
Stojancevic, M., Pavlovic, N., Golocorbin-Kon, S., Mikov, M., 2013. Application of bile acids in drug formulation and delivery. Front. Life Sci. 7, 112–122.
Tan, G., Yu, S., Pan, H., Li, J., Liu, D., Yuan, K., Yang, X., Pan, W., 2017. Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: a more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. Int. J. Biol. Macromol. 94, 355–363.
Tártara, L.I., Quinteros, D.A., Saino, V., Allemandi, D.A., Palma, S.D., 2012. Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. J. Ocul. Pharmacol. Ther. 28 (2), 102–109.
Tsai, M.J., Huang, Y.B., Fang, J.W., Fu, Y.S., Wu, P.C., 2015. Preparation and characterization of naringenin-loaded elastic liposomes for topical application. PLoS One 10 (7), e0131026.
Tuomela, A., Liu, P., Puranen, J., Rönkkö, S., Laaksonen, T., Kalesnykas, G., Oksala, O., Ilkka, J., Laru, J., Järvinen, K., Hirvonen, J., Peltonen, L., 2014. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated intraocular pressure in vivo. Int. J. Pharm. 467, 34–41.
Ulander, J., Haymet, A.D.J., 2003. Permeation across hydrated DPPC lipid bilayers: simulation of the titrable amphiphilic drug valproic acid. Biophys. J. 85, 3475–3484.
Yu, S., Wang, Q.M., Wang, X., Liu, D., Zhang, W., Ye, T., Yang, X., Pan, W., 2015. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for opthalmic delivery of timolol maleate. Int. J. Pharm. 480, 128–136.